



Glycodendrimères : de la synthèse aux interactions biologiques

Laure L'Haridon

► To cite this version:

Laure L'Haridon. Glycodendrimères : de la synthèse aux interactions biologiques. Chimie organique. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2015. Français. NNT : 2015PA066513 . tel-01309212

HAL Id: tel-01309212

<https://theses.hal.science/tel-01309212>

Submitted on 29 Apr 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**THESE DE DOCTORAT DE
L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE**

Spécialité : Chimie Organique
Ecole doctorale : Chimie Moléculaire

Présentée par
Mlle Laure L'HARIDON

Pour obtenir le grade de
DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

**Glycodendrimères :
de la synthèse aux interactions biologiques**

Soutenue le 13 Novembre 2015, devant le jury composé de :

Pr. Vincent FERRIERES	Rapporteur
Pr. José KOVENSKY	Rapporteur
Dr. Anne VESSIERES	Examineur
Dr. Jean-Maurice MALLET	Directeur de thèse

Université Pierre & Marie Curie - Paris 6
Bureau d'accueil, inscription des doctorants et
base de données
Esc G, 2ème étage
15 rue de l'école de médecine
75270-PARIS CEDEX 06

Tél. Secrétariat : 01 42 34 68 35
Fax : 01 42 34 68 40
Tél. pour les étudiants de A à EL : 01 42 34 69 54
Tél. pour les étudiants de EM à MON : 01 42 34 68 41
Tél. pour les étudiants de MOO à Z : 01 42 34 68 51
E-mail : scolarite.doctorat@upmc.fr

Remerciements

Je tiens tout d'abord à adresser mes remerciements aux membres du jury qui ont eu la patience d'évaluer ce travail : les professeurs Vincent FERRIERES et José KOVENSKY et le docteur Anne VESSIERES.

Je voudrais remercier Jean-maurice MALLET de m'avoir accueilli en stage de master 2 dans l'équipe puis d'avoir continué la collaboration avec cette thèse. Je le remercie de la confiance qu'il a su me témoigner pendant ces trois années, des discussions et de la bonne humeur qu'il a su implanter dans le bureau.

Je voudrais aussi remercier Jean-Phillipe TRANCHIER pour l'opportunité qu'il m'a donné de participer aux travaux pratiques de license 3, ça a été une très bonne expérience qui m'a reconcilié avec l'enseignement.

Je tiens à remercier les membres du bureau, ancien et présent : Laurent (Biloute), pilier indispensable du laboratoire dont les délires maintiennent l'équipe soudée, Pascal, toujours à mettre la main à la pâte, Marilyne, docteur toujours souriante, Mayeul, puit de connaissance qui ne se prend pas la tête, son départ s'est fait bien sentir et Nicolas ; les membres de l'équipe 1 du laboratoire des biomolécules : Géraldine, binôme de paillasser pendant les travaux et dont les discussions sur tout et n'importe quoi me manqueront, Sarah, Rodrigues, pilier indispensable des peptidistes, Alexandre, d'une aide précieuse pour les peptides et compagnon de galère, Margherita, Emilie, Malthide, Roba, Clothilde, Solange, Gérard, Eliane et Stéphane ; et les membres de l'ENS : Marie, Karine et Yvon, de nombreuses engueulades découlant finalement sur de l'amitié.

Au tour des amis maintenant, merci à mes amis de Marseille, Flavia, Manon, Kelly et Manu, qui malgré la distance et l'éloignement sont toujours là, vous me rappelez une période où tout était si simple et différent! ; à mes amis de Rennes, heureusement certains sont à Paris maintenant, Mumu, Terry, Laure D, Maëlle, François, Zhilin, Célia, Nicolas et Claire avec qui on continue les traditionnels restos ; et à mes nouveaux amis

de Paris, Anaïs, technicienne du tonnerre qui adore les crocos et les restos!, Andreas, Elena, Paul, Pierre-Hadrien, Thomas, Jean-Philippe, Fred, Paul 1, Paul 2, Estelle et Christine, mes compagnons de soupe. Merci à tous d'avoir rendu la vie parisienne si attrayante!

Je tiens à remercier ma famille en particulier mes parents, mes frères et ma soeur qui m'ont toujours soutenu inconditionnellement, le petit bébé de la famille. Mais aussi mon oncle, Jean-Marc, pour ses conseils de dernière minute sur la correction, elles ont été très pratiques, rapides et m'ont bien aidé ; et bien sur ma cousine adorée, Marine.

Je voudrais enfin remercier Pierre qui a su trouver avec brio les mots pour me soutenir, me déstresser, me faire rire en d'autres termes, de m'aimer.

*"Notre plus grande gloire n'est pas de ne jamais tomber,
mais de nous relever à chaque fois..."*
Confucius

Abréviation et acronymes

2-CTC	2-chlorotrityle
9-BBN	9-Borabicyclo(3.3.1)nonane
ACN	Acétonitrile
Alloc	Allyloxycarbonyl
APTS	Acide paratoluènesulfonique
ATR-FTIR	<i>Attenuated Total Reflection- Fourier transform infrared spectroscopy</i>
ATRP	Polymérisation Radicalaire contrôlée par Transfert d'Atome
bis-MPA	acide 2,2-bis(hydroxy-méthyl)propionique
Boc	Tert-butyloxycarbonyl
BOP	Benzotriazol-1-yl-oxytris-(diméthylamino) phosphonium hexafluorophosphate
CD209	Cluster of differentiation 209
C _{eff}	Concentration effective
cDC	DC conventionnelles
CLIP	<i>Class II-associated invariant chain peptide</i>
CLRs	<i>C-type lectin receptors</i> - Récepteurs de lectine de type C
CLRP	<i>Controlled/Living free-Radical Polymerization</i>
CRD	<i>C-type carbohydrate recognition domain</i> - Domaine de reconnaissance de motifs saccharidiques dépendant du calcium
C _{sol}	Concentration globale de la solution
C-term	C-terminal
CuAAC	<i>Copper(I)-catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition</i>
DC	Cellule dendritique
DCC	<i>N,N'</i> -dicyclohexylcarbodiimide
DCM	Dichlorométhane
DC-SIGN	<i>Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non- integrin</i>
DIPEA	<i>N,N</i> -diisopropyléthylamine
DMAP	4-diméthylaminopyridine

DMF	<i>N,N</i> -diméthylformamide
DVB	Divinylbenzène
EDC	Domaine extracellulaire étendu
EDT	Ethanedithiol
EDTA	Ethylène diamine tétra-acétique
Eq	Equivalent
ESI	<i>Electrospray ionization</i> - Ionisation par électrospray
Fmoc	<i>N</i> - fluorenylmethoxycarbonyl
GlcNAc	<i>N</i> -acétylglucosamine
GM-CSF	<i>Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor</i>
GNP	Glyconanoparticules
HATU	1-[Bis(diméthylamino)méthylene]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridinium 3-oxid hexafluorophosphate
HBTU	<i>O</i> -(Benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium hexafluorophosphate
HCTU	<i>O</i> -(6-Chlorobenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium hexafluorophosphate
H ₂ SO ₄ .SiO ₂	Acide sulfurique immobilisé sur silice
HOAt	1-hydroxy-7-azabenzotriazole
HOBt	1-hydroxybenzotriazole
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
ivDde	4,4-diméthyl-2,6-dioxocyclohex-1-ylidene)-3-méthylbutyl
MALDI	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation</i>
Man-BSA	Albumine de sérum bovin fonctionnalisé par des mannoses
mDC	DC myéloïdes
NMP	<i>N</i> -méthyl-2-pyrrolidone
PA	Polyamide
PAMAM	Poly(amidoamine)
PAMP	Motifs moléculaire associé à des pathogènes
PEG	Polyéthylène glycol
PMDTA	Pentamethyldiéthylènetriamine
PPI	Poly(propylène imine)
PRRs	<i>Pattern recognition receptors</i> - Récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires

PS	Polystyrène
PyAOP	7-Azabenzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidino phosphonium hexafluorophosphate
PyBOP	Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidino phosphonium hexafluorophosphate
RAFT	Polymérisation Radicalaire contrôlée par Transfert de chaîne Réversible par Addition-Fragmentation
RMN	Résonance magnétique nucléaire
ROMP	Polymérisation par Ouverture de Cycle par métathèse
ROP	Polymérisation par Ouverture de Cycle
SPPS	Synthèse peptique en phase solide
SPR	<i>Surface Plasmon Resonance</i>
TAP	Protéine de transport d'antigène
TBAB	Bromure de tetra- <i>n</i> -butylammonium
TBTA	Tris(benzyl-1,2,3-triazol-4-yl)méthyl amine
TBTU	<i>O</i> -(Benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium tetrafluoroborate
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphine
Temp	Température
TFA	Acide trifluoroacétique
THF	Tétrahydrofurane
TLR	<i>Toll like receptors</i> - Récepteurs de type Toll
TRIS	Tris(hydroxyméthyl)aminométhane

Publication/Communication

Ce travail a donné lieu aux communications orales et écrites et les publications suivantes :

Communications :

Orales

Journée scientifique de l'UMR7203, UPMC, Paris, 07/07/2015

Journée de l'Ecole Doctorale de Chimie Moléculaire ED406, UPMC, Paris, 05-06/06/2014

Journée des Jeunes Chercheurs, ENS, Paris, 03/2014

Journée bibliographique de l'Ecole Doctorale de Chimie Moléculaire ED406, UPMC, Paris, 24/01/2013

Posters

Journée de la montagne Ste-Geneviève, Institut Curie, Paris, 05/06/2014

Rencontre Chimique Organique (RCO), Cordeliers, Paris, 04/04/2014

Publications :

Carbohydrate based dendrimers, L L'Haridon, J-M Mallet *Carbohydrate Chemistry* **2014** *40*, **257-269**

Table des matières

INTRODUCTION.....	17
I. IMMUNOLOGIE	19
A. LES CELLULES DENDRITIQUES ET LE SYSTEME IMMUNITAIRE INNE.....	19
B. LES CELLULES DENDRITIQUES ET LE SYSTEME IMMUNITAIRE ADAPTATIF	21
C. DC-SIGN	27
D. LES CELLULES DENDRITIQUES ET LA VACCINATION	30
II. STRUCTURES MULTIVALENTES.....	35
A. MULTIVALENCE.....	35
B. STRUCTURES GLYCOSYLEES MULTIVALENTES	38
III. GLYCODENDRIMERES.....	50
A. DEFINITIONS, NOTIONS DE BASE.....	50
B. GLYCODENDRIMERES ENTIEREMENT BASES SUR DES ELEMENTS GLYCOSYLES.....	53
C. GLYCODENDRIMERES ENVELOPPES D'ELEMENTS GLYCOSYLES	57
IV. CONCLUSION.....	65
CHAPITRE I. SYNTHÈSE DES BLOCS.....	67
I. PROJET	69
A. CHOIX DES STRUCTURES	69
B. DIFFERENTS BLOCS DE SYNTHÈSE CHOISIS	72
II. SYNTHÈSE DES BLOCS, EXEMPLE SUR CEUX BASES SUR L' A-D-GLUCOPYRANOSIDE DE METHYLE	74
A. TRITYLATION	74
B. SYNTHÈSE DES BRAS ESPACEURS : PER-ALLYLATION ET PER- HYDROBORATION	75
C. AZIDATION	78
D. CHANGEMENT DE PROTECTION DE L'ALCOOL PRIMAIRE.....	81

E.	PREPARATION DU BLOC TERMINATEUR	82
F.	PREPARATION DU BLOC ÉLONGATEUR.....	83
III.	EXPANSION DE LA SYNTHÈSE : PENTAERYTHRITOL ET D-MANNITOL	86
A.	SYNTHÈSE DES BLOCS BASES SUR LE PENTAERYTHRITOL	86
B.	SYNTHÈSE DES BLOCS BASES SUR LE D-MANNITOL	89
IV.	SYNTHÈSE DE LA PARTIE SACCHARIDIQUE DU DENDRIMÈRE.....	94
V.	CONCLUSION	97

CHAPITRE II. SYNTHÈSE SUPPORTÉE **99**

I.	PREPARATION DE LA RESINE ET SYNTHÈSE DES GÉNÉRATIONS	101
A.	GENERALITES	101
B.	PREPARATION DU MONOMÈRE DE DÉPART.....	111
C.	SYNTHÈSE DES GÉNÉRATIONS.....	113
II.	ACCROCHAGE DU SACCHARIDE FINAL.....	116
A.	CLICK, GENERALITES	116
B.	CUAAC SUR SUPPORT SOLIDE	122
C.	SYNTHÈSE.....	125
III.	ANALYSES	132
A.	HPLC	133
B.	RMN	135
C.	<i>MATRIX-ASSISTED LASER DESORPTION/IONISATION (MALDI)</i>	137
IV.	CHANGEMENTS DE STRATÉGIE DE SYNTHÈSE	140
A.	REDUCTION DES AZOTURES EN AMINES SUR SUPPORT SOLIDE	140
B.	NOUVELLE SYNTHÈSE	146
V.	CONCLUSION	153

CHAPITRE III. ETUDES BIOLOGIQUES.....	155
I. PRINCIPE DU BIACORE®	157
A. GENERALITES	157
B. APPLICATION AUX BIOMOLECULES	159
II. EXPERIENCES DE BIACORE®	163
A. CONDITIONS D'ANALYSES.....	163
B. ETAT DE L'ART	165
C. RESULTATS ET DISCUSSION	169
III. CONCLUSION.....	173
CONCLUSION GENERALE	175
PARTIE EXPERIMENTALE	177
I. ORGANIC SYNTHESIS	179
A. WARNINGS	179
B. EXPERIMENTAL PART: L-FUCOSE.....	181
C. EXPERIMENTAL PART: METHYL A-D-GLUCOPYRANOSIDE	184
D. EXPERIMENTAL PART: PENTAERYTHRITOL.....	196
E. EXPERIMENTAL PART: D-MANNITOL WITH 5 BRANCHES	206
F. EXPERIMENTAL PART: D-MANNITOL WITH 4 BRANCHES.....	215
II. PEPTIDE SYNTHESIS.....	221
A. METHODS	221
B. DENDRIMER WITH 9 A-FUCOSES, A S-TRT-CYSTEINE FROM METHYL A-D-GLUCOPYRANOSIDE (15A).	224
C. DENDRIMER WITH 27 A-FUCOSES, A S-TRT-CYSTEINE FROM METHYL A-D-GLUCOPYRANOSIDE (20A).....	230
D. DENDRIMER WITH 9 A-FUCOSES, A LYSINE FROM METHYL A-D-GLUCOPYRANOSIDE	235
BIBLIOGRAPHIE	239

Introduction

Les cellules dendritiques permettent de passer d'une réponse immunitaire non spécifique à une réponse immunitaire spécifique. L'efficacité des cellules dendritiques dans leur rôle de sentinelle est due à la grande diversité des récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires exprimés à leur surface.

Pour augmenter l'interaction faible entre une unité glycosidique et ce récepteur, des ligands multivalents sont nécessaires. Différentes structures existent : glyoclusters, glycopolymères, glyconanoparticules, et enfin les glycodendrimères.

Ces derniers peuvent être divisés en 3 catégories suivant la place de leurs éléments saccharidiques : soit au coeur du dendrimère, soit au coeur et sur l'enveloppe de celui-ci, soit seulement sur son enveloppe.

I. Immunologie

A. Les cellules dendritiques et le système immunitaire inné (cf. Figure 2¹)

1. Les cellules dendritiques

Les cellules dendritiques (DC) sont des cellules essentielles pour les systèmes immunitaires inné et adaptatif. Elles sont situées principalement au niveau des barrières de l'organisme avec l'extérieur, en d'autres termes, les muqueuses et la peau. Elles n'y représentent que 1 à 3% des cellules mais c'est suffisant pour déclencher une réponse immunitaire efficace. On les retrouve en plus petite quantité dans le sang (environ 1% des leucocytes circulants) et dans les organes lymphoïdes. Elles font partie des cellules présentatrices d'antigènes et sont les seules cellules capables d'activer les lymphocytes T naïfs et ainsi d'induire une réponse primaire^{2,3}.

Chez l'Homme, on les classe en deux sous-types⁴ : les DC myéloïdes, appelées aussi conventionnelles (mDC ou cDC), et les DC plasmacytoïdes (pDC). Les mDC ont une population beaucoup plus hétérogène que les pDC, elles comprennent les cellules de Langerhans, les DC des organes lymphoïdes, les DC du sang et les mDC interstitielles.

Les cellules dendritiques possèdent de multiples récepteurs, différents états (immatures ou matures, cf. Figure 1⁵) qui permettent une prise en charge complète des pathogènes et qui seront discutés plus en détail dans ce chapitre.

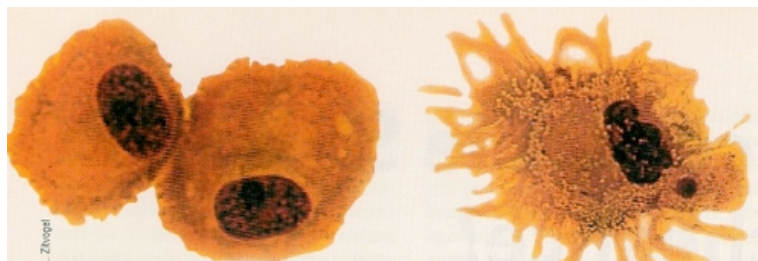


Figure 1 - A gauche, cellule dendritique immature; à droite, cellule dendritique mature.

2. Les cellules dendritiques et le système immunitaire inné

Les cellules dendritiques circulent dans le sang pour se positionner dans les tissus. A ce stade là, elles sont dites immatures pour refléter leur état où leur capacité d'endocytose est importante. Elles peuvent reconnaître des motifs moléculaire associé à des pathogènes (PAMP - *Pathogen-associated molecular patterns*) grâce à leurs différents récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PRRs - *Pattern Recognition Receptors*). Parmi eux, on peut noter la famille des récepteurs de type Toll (TLR - *Toll-Like Receptors*)^{6, 7}, le récepteur mannose⁸ et le récepteur CD14⁹. En réponse, elles vont relâcher des cytokines, tel que de l'interferon α , qui activeront les macrophages, les cellules NKT (*Natural Killer T*) et les cellules NK (*Natural Killer*) afin qu'elles attaquent le pathogène¹. Il s'agit de la réponse du système immunitaire dit inné. Ce processus, rapide, est néanmoins de courte durée et non spécifique. Il sert de première barrière aux pathogènes en attendant une réponse plus spécifique¹⁰.

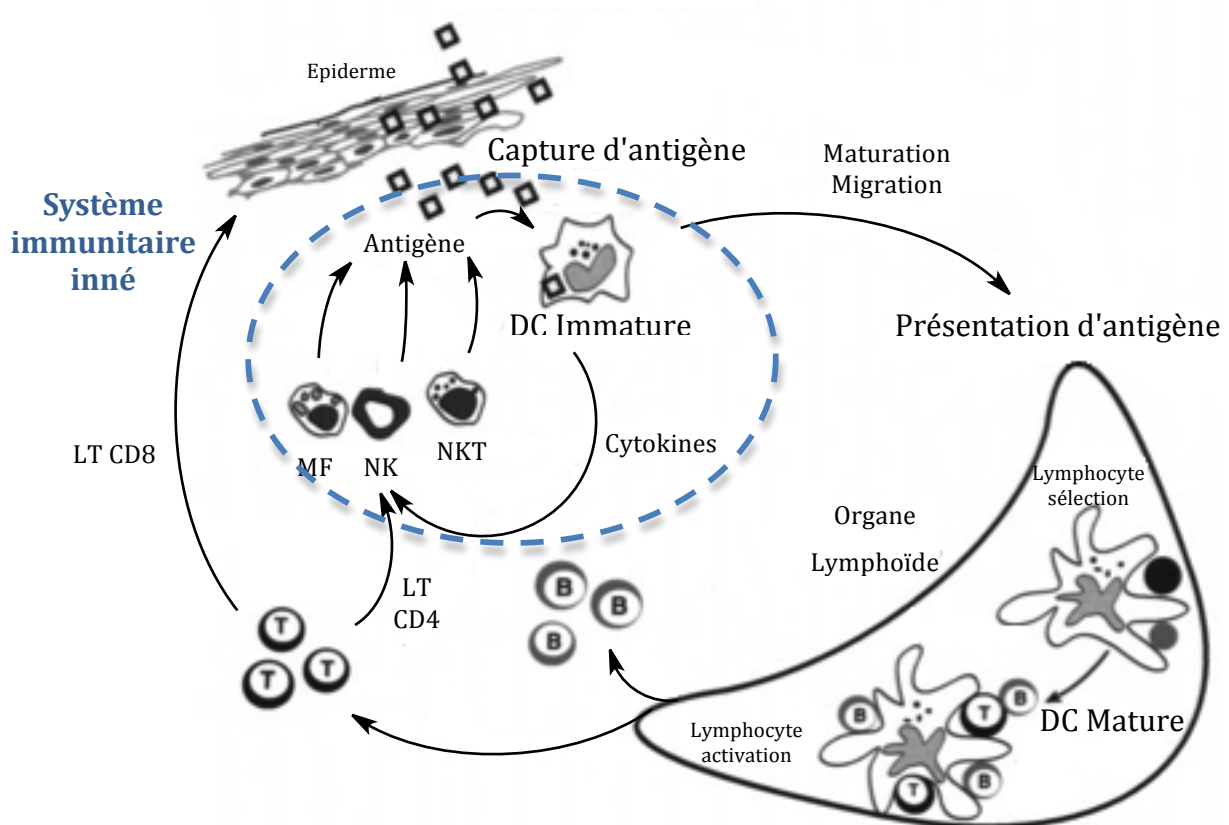


Figure 2 - Différents rôles des DC en particulier dans le système immunitaire inné (LT pour Lymphocytes T et MF pour macrophage).

B. Les cellules dendritiques et le système immunitaire adaptatif (cf. Figure 7¹)

1. Capture et présentation de l'antigène

Les cellules dendritiques dites immatures sont présentes au niveau de toutes les barrières de l'organisme avec l'extérieur. Elles capturent continuellement des pathogènes (comme les bactéries, les parasites ou les toxines situés dans les tissus) grâce à de multiples récepteurs différents assurant ainsi une capture et une réponse immunitaire efficaces.

Différents processus d'endocytose ont été remarqués suivant la nature et le type cellulaire de l'antigène^{11, 12, 13, 14}. Celui-ci peut être capturé soit par phagocytose, par pinocytose ou bien par endocytose à récepteur tel que des lectines de type C (cf. Figure 3). Contrairement au dernier, les deux premiers ne sont pas spécifiques, ils internalisent le fluide intracellulaire. Ils se distinguent par la taille des vésicules impliquées dans l'endocytose : on commence à parler de phagocytose pour des diamètres de vésicules supérieurs à 250 nm, et de pinocytose pour ceux inférieurs à ce diamètre.

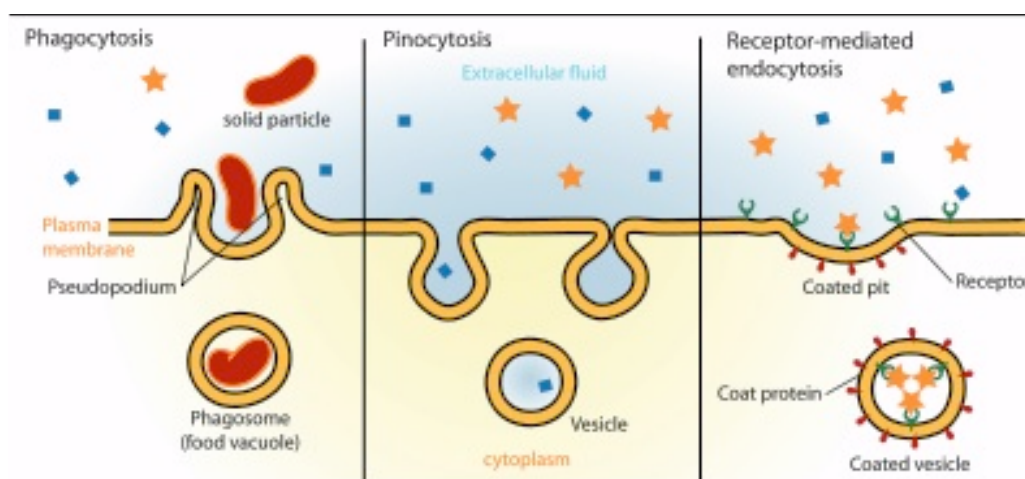


Figure 3 - Différents processus d'endocytose.

L'antigène internalisé est ensuite envoyé vers les voies de protéolyse qui vont le découper en peptides. Ceux-ci vont se diriger vers le compartiment de classe II où se trouve la molécule du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH II) pour s'y lier et se présenter à la surface de la cellule en tant que CMH II-peptide (cf. Figure 4¹⁵).

2. Maturation des cellules dendritiques et présentation antigénique

Dans le réticulum endoplasmique, le CMH II est protégé des peptides endogènes jusqu'à la fin de son assemblage par une protéine appelée CD74, Li, ou encore chaîne invariante. Une partie de Li peut se lier à de la myosine II qui encourage l'exportation du CMH II hors du réticulum endoplasmique vers le compartiment de classe II où se trouvent les fragments peptidiques de l'antigène. La myosine II n'est alors plus utilisée pour aider à la mobilité de la cellule, faisant diminuer la vitesse de cette dernière.

Lorsque le CMH II a atteint son but, la myosine II est libérée entraînant une hausse de la mobilité de la cellule. Par ailleurs, sous l'effet de cathepsine S (une protéase lysosomale), une partie de Li va se cliver, laissant seulement un fragment appelé CLIP (*Class II-associated invariant chain peptide*) sur le CMH II. Il sert à préserver ce dernier d'interactions avec des fragments peptidiques endogènes jusqu'à l'intervention de l'HLA-DM qui permettra aux fragments exogènes de s'y lier (Figure 4¹⁵). Enfin, le complexe CMH II-peptide est transféré à la surface de la cellule où il est exprimé de façon stable.

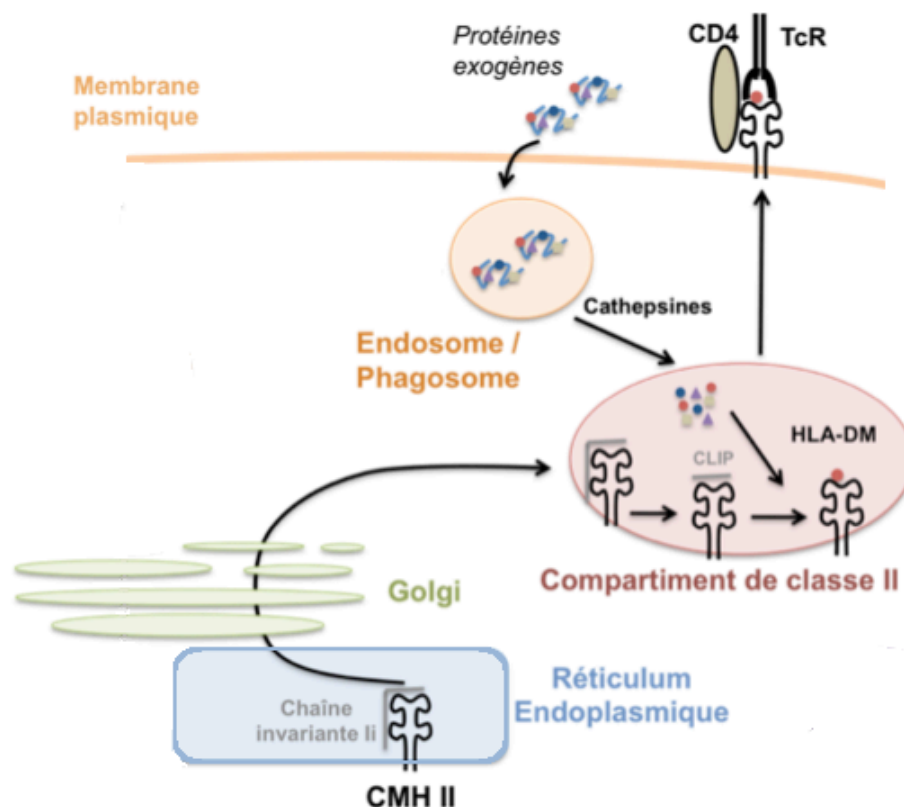


Figure 4 -Présentation antigénique par le CMH II d'une DC.

La capture d'antigène entraîne des phases de ralentissement de la cellule dues à la formation de complexes Li-myosine II. Ces phases permettent à la cellule de jongler efficacement entre mobilité et capture efficace d'antigènes durant leur période immature.

Juste après l'activation, il existe une courte durée durant laquelle la synthèse et l'association de Li-myosine II est accélérée entraînant un fort ralentissement de la cellule et une capture d'antigène maximale. Ce phénomène permet d'accumuler à la surface de la cellule une quantité considérable du complexe CMH II-peptide pour être mieux reconnu par la suite¹⁶.

S'ensuit une forte diminution des capacités d'endocytose au profit de la mobilité de la cellule. Les cellules dendritiques changent d'apparence (cf. Figure 1 et Figure 5), elles sont alors appelées matures et se dirigent vers les organes lymphoïdes.

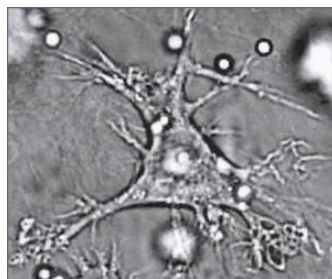


Figure 5 - Cellule dendritique mature.

3. Les lymphocytes T CD4 et présentation antigénique des cellules dendritiques matures

Les lymphocytes T se classent en deux catégories suivant la molécule accessoire qu'ils expriment : lymphocytes T CD8 et les lymphocytes T CD4.

Les lymphocytes T CD4, appelés aussi lymphocytes T auxiliaires, s'occupent des pathogènes extracellulaires. Environ un sur un million de ces lymphocytes seulement ont la même spécificité, la probabilité que l'un d'eux trouve un antigène exogène est alors plutôt faible. Ils sont ainsi regroupés dans les organes lymphoïdes où ils reconnaissent des fragments spécifiques qui leur sont présentés par les cellules dendritiques via leur CMH II.

Les cellules dendritiques matures se dirigent donc vers les organes lymphoïdes où une forte concentration de lymphocytes T CD4 les attend. Bousso et al. se sont

intéressés aux interactions entre ces deux entités en utilisant un microscope laser à deux photons (TPLSM - *two-photon laser scanning microscopy*)¹⁷. Cette technique leur a permis l'acquisition d'images en 3 dimensions d'un ganglion lymphatique contenant des cellules dendritiques et des lymphocytes T, tous deux fluorescents. Le signal généré est enregistré dans des plans focaux successifs. Le processus est répété toutes les 10-30 secondes sur une période de quelques heures afin de générer un film en rassemblant toutes les informations multidimensionnelles. Cette technique est de plus en plus utilisée pour l'observation de comportement dynamique *in vivo*¹⁸.

En absence d'antigènes à présenter, une cellule dendritique interagit avec 500 à 5000 lymphocytes T distincts par heure¹⁹. Cela explique comment, même en faible nombre, les cellules présentatrices d'antigènes peuvent tout de même atteindre les rares lymphocytes T spécifiques aux pathogènes présentés et déclencher une réponse immunitaire adaptative. Les lymphocytes T ne s'arrêtent pas complètement, juste décélèrent le temps d'un contact de 3-5 minutes avec la cellule.

Lorsque les cellules dendritiques sont porteuses d'antigènes, deux modes d'interactions ont été observés. Un premier où les contacts sont transitoires, pas plus de 10 minutes. Ils ressemblent fortement aux interactions sans antigènes bien que, dans ce cas là, une partie déclenche une activation des lymphocytes T. Dans l'autre mode, les contacts sont beaucoup plus longs et stables, se maintenant pendant toute la durée de l'acquisition, c'est-à-dire entre 20 et 60 minutes. Vu la stabilité de ces contacts, Bousso et al. ont supposé que leurs durées pouvaient aller de 2 à 24 heures. Ce sont ces interactions qui provoquent une forte activation des lymphocytes T.

4. Réponse immunitaire

L'activation des lymphocytes T CD4 spécifiques entraîne leur clonage, ramenant transitoirement leur proportion à 1 sur 1000. Ces lymphocytes migrent jusqu'aux tissus abimés puis sécrètent des cytokines permettant l'activation des macrophages, des cellules NK, amplifiant ainsi la réponse spécifique contre un pathogène.

Les lymphocytes T CD8, appelés aussi lymphocytes T cytotoxiques, s'occupent des pathogènes intracellulaires. Ils inspectent les antigènes endogènes des cellules qui sont présentés au niveau du CMH I de cette dernière. Lorsqu'il en reconnaît un dont il est spécifique, il déclenche l'apoptose de la cellule.

Cependant ce mode de fonctionnement ne peut expliquer le fait que des antigènes venant de cellules tumorales, les cellules infectées par un pathogène ou même des cellules apoptiques soient présentées par le CMH I. Des pathogènes exogènes sont bien traité par le CMH I. C'est ce qu'on appelle la présentation croisée (cf. Figure 6¹⁵)^{20, 21}.

L'antigène échappe à la dégradation lysosomale par translocation au cytosol pour être dégradé par les protéasomes. Les fragments peptidiques résultant sont transportés dans le réticulum plasmique grâce à une protéine de transport d'antigène (TAP). Le complexe CMH I-peptide est alors présenté à la surface de la cellule. Les lymphocytes T CD8 vont pouvoir reconnaître le fragment se diviser et se différencier pour pouvoir lyser directement les cibles.

Similairement aux lymphocytes T, peu de lymphocytes B reconnaissent le même épitope d'antigène. Ils sont donc concentrés dans les ganglions lymphatiques en attendant que des cellules dendritiques leurs amènent des antigènes. Par contre, cette fois-ci, la structure tertiaire et quaternaire du déterminant antigénique de l'antigène est importante pour la reconnaissance par les lymphocytes B. L'antigène ne peut donc pas être découpé en fragment peptidique et présenté à la surface de la cellule. Le rôle de la

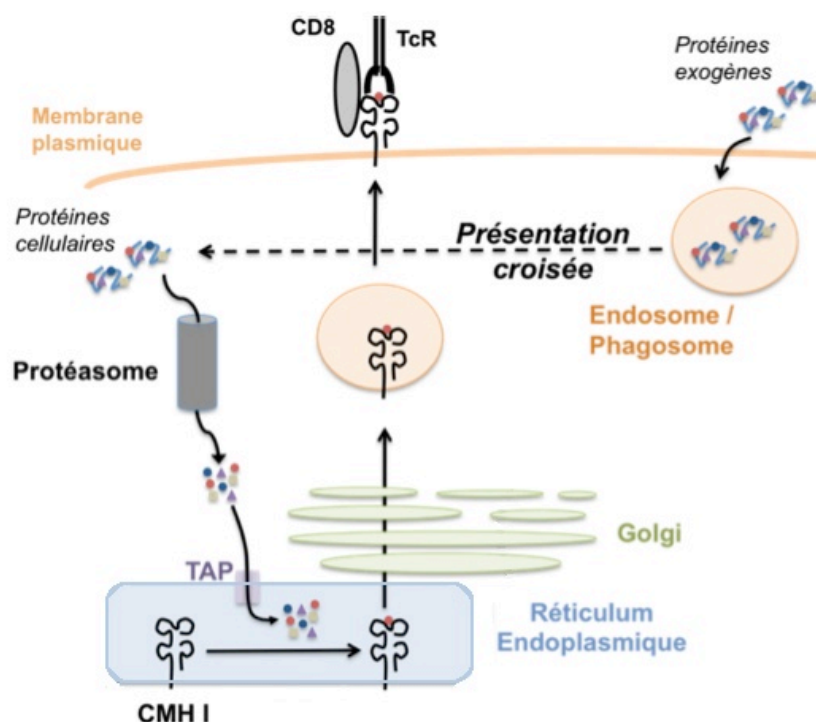


Figure 6 - Présentation croisée d'un antigène par le CMH I d'une DC.

cellule dendritique s'arrête à un rôle de livreur d'antigène.

Une fois le contact avec l'antigène fait, le lymphocyte B bloque ses récepteurs BCR. S'il entre en contact avec un lymphocyte T CD4 et les cytokines des lymphocytes T, il se divise et se différencie. Dans le cas contraire, il revient à son état précédent. Les lymphocytes B se différencient en plasmocytes, ils produiront des anticorps qui neutraliseront le pathogène initial.

Lorsque l'infection est passée, c'est-à-dire qu'il n'y a plus d'antigène libre stimulant les lymphocytes, le système immunitaire entre dans une phase de développement de la mémoire. Le remplacement de l'antigène libre par un complexe antigène/anticorps entraîne un changement de signal lors de son interaction avec les lymphocytes B spécifiques. De plus, des changements dans la surface d'interaction des lymphocytes T et B et des cytokines entraînent un changement de différenciation des lymphocytes B en lymphocytes B mémoire. Ainsi, lors d'une seconde infection de l'antigène, ces derniers auront mémorisés les propriétés de l'antigène et créeront une réponse immunitaire plus rapide, plus longue et plus intense²².

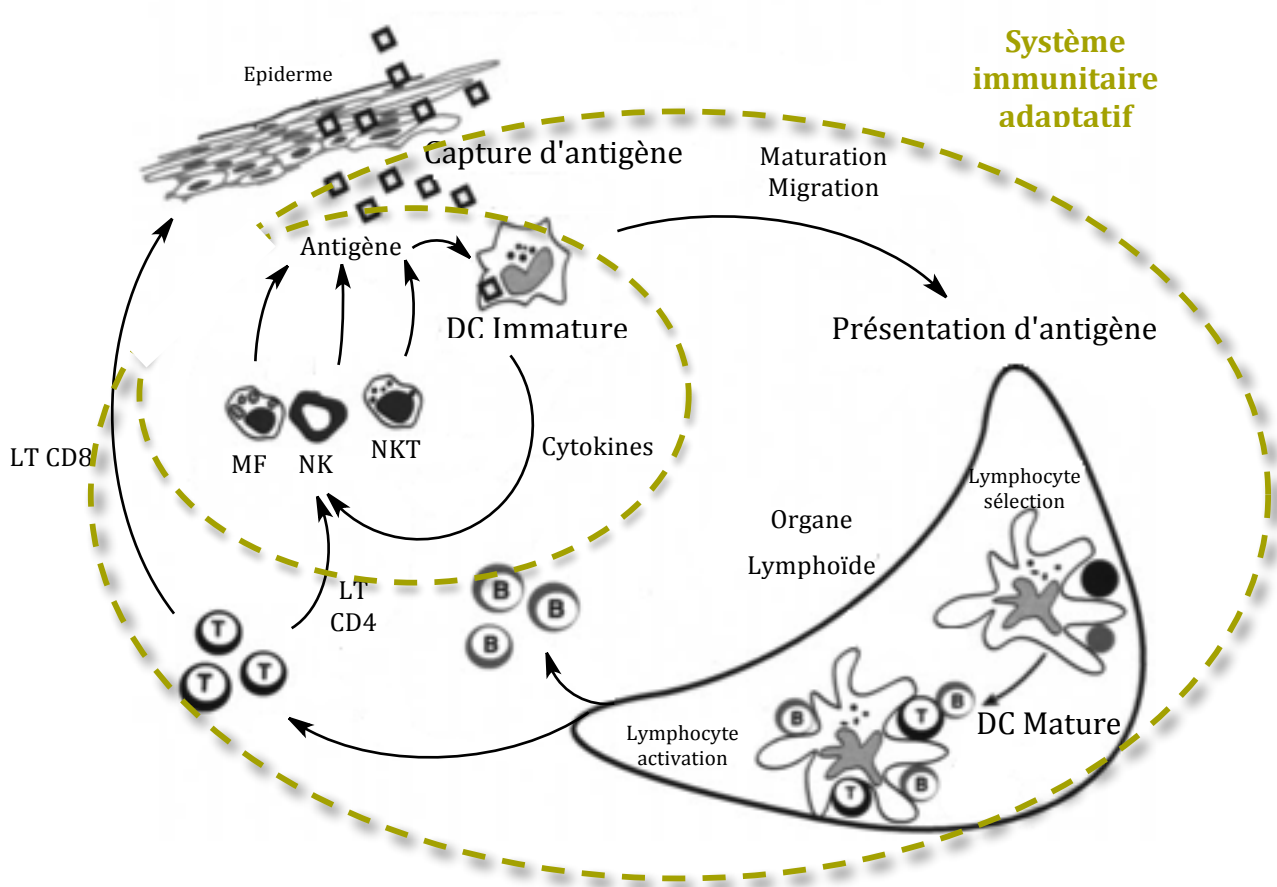


Figure 7 - Différents rôles des DC en particulier dans le système immunitaire adaptatif (LT pour Lymphocytes T et MF pour macrophage).

C. DC-SIGN

L'efficacité des cellules dendritiques dans leur rôle de sentinelle est due à la grande diversité des récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires exprimés à leur surface. Mise à part les récepteurs de type Toll, ils possèdent aussi des récepteurs de lectine de type C (CLRs) dédiés spécifiquement à la reconnaissance de pathogènes ayant des motifs glycosylés. Parmi eux, DC-SIGN (*Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin*) a attiré beaucoup d'attention durant la décennie passée de part leur rôle dans la transmission du virus HIV aux cellules T. En effet, c'est un récepteur souvent pris en otage par d'autres pathogènes pour échapper à la réponse immunitaire. Plus récemment, il a été identifié comme participant à la modulation de la réponse immunitaire.

1. Structure Globale

DC-SIGN, aussi appelé 'cluster of differentiation 209' (CD209), est une protéine transmembranaire organisée en nano-domaines et distribuée aléatoirement sur la membrane plasmique des cellules dendritiques. Elle est composée de trois parties (cf. Figure 8²³) :

- une région cytoplasmique courte impliquée dans le transport de la lectine vers la surface, la signalisation et l'internalisation du pathogène ;
- une région transmembranaire permettant d'insérer la lectine dans la membrane; et
- un domaine extracellulaire étendu (EDC) projetant un récepteur tétramérique jusqu'à 320 Å au-dessus de la surface de la cellule, comme un piège pour de potentiels pathogènes. Chaque branche est divisée en deux régions distinctes tant structurellement que fonctionnellement, une région coudée, et un domaine de reconnaissance de motifs saccharidiques dépendant du calcium (CRD) qui est le coeur du processus de reconnaissance des molécules par DC-SIGN.

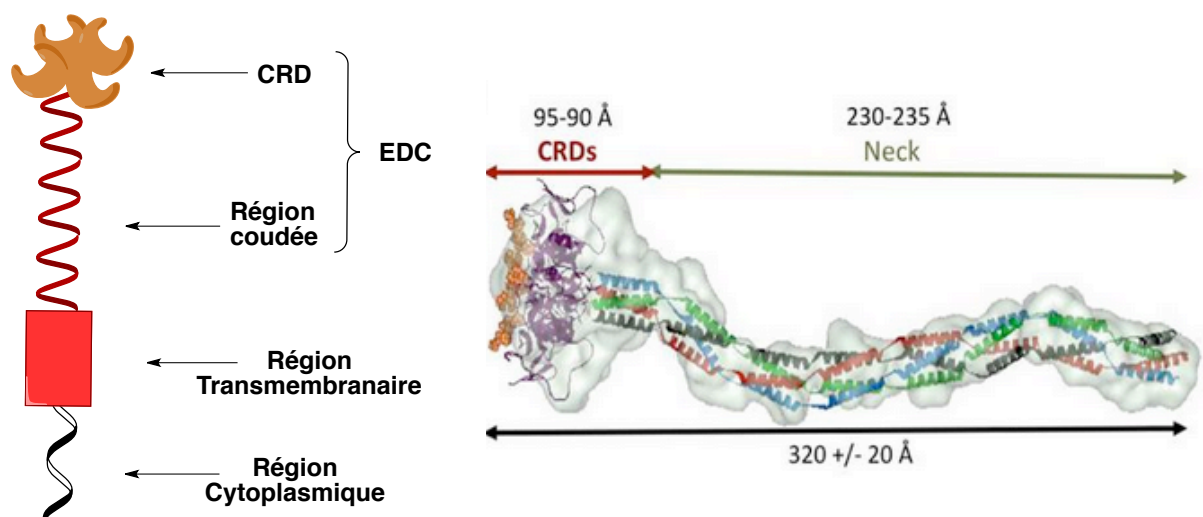


Figure 8 - A droite, domaine d'organisation de DC-SIGN ; à gauche, agrandissement de l'EDC.

2. Interactions avec des ligands glycosylés

Le CRD de DC-SIGN est dépendant du calcium, il contient 3 sites occupés en interaction avec le calcium (cf. Figure 9.A.) et des motifs tri-peptidiques EPN (Glu-Pro-Asn) qui explique la spécificité du récepteur pour les groupes mannosylés (Man), *N*-acétylglucosamines (GlcNAc), glucosylés (Glc) et L-fucosylés (Fuc)²⁴.

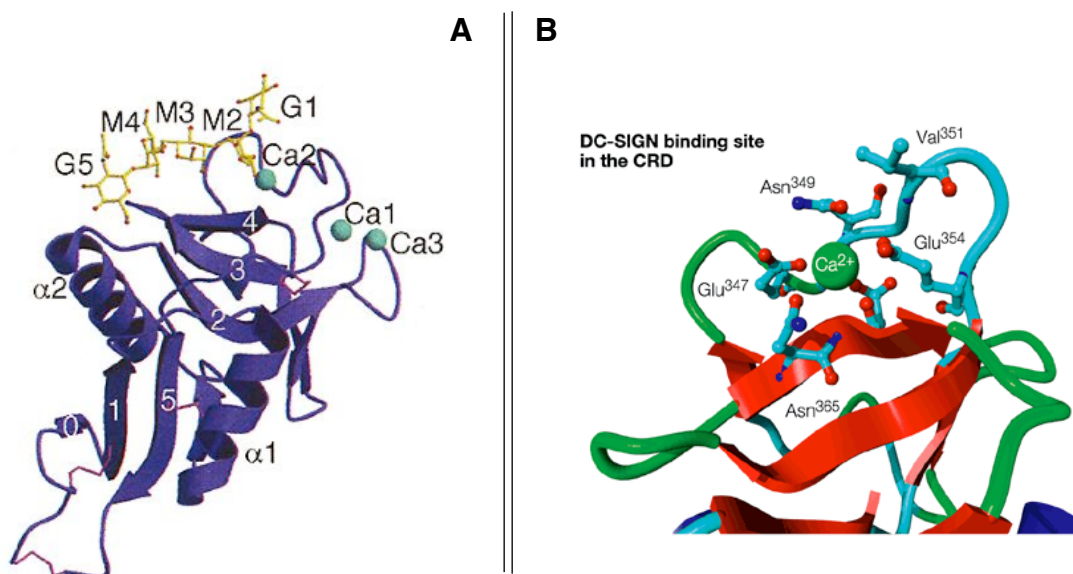


Figure 9 - A. Emplacement des 3 calcium (Ca1, Ca2 et Ca3) du CRD de DC-SIGN ; B. Agrandissement du site 2 du CRD de DC-SIGN

Le calcium situé au site 1, c'est-à-dire le site auxiliaire, est nécessaire pour la bonne orientation du site d'interaction primaire, le site 2, sans lui, aucune interaction n'est possible²⁵. Le calcium situé au site 3 est localisé tout près du site 1 et toutes les chaînes latérales de ce site coordinent avec le calcium et donc participent à la formation du site 1²⁶.

Le calcium situé au site 2 se coordine avec le ligand (cf. Figure 9B.)²⁴. Pour un fragment mannosylé ou contenant une *N*-acétylglucosamine, la coordination se fait via leurs groupements hydroxy équatoriaux 3 et 4. (cf. Figure 10.A.²⁴). Dans le cas d'un fragment fucosidique, l'accroche se fait par les groupements hydroxy équatorial 3 et axial 4 avec en prime des interactions de van der Waals entre le groupement hydroxy 2 et le résidu Val 351 de la protéine (cf. Figure 10.C.²⁷).

Pour les oligosaccharides contenant ces fragments, comme Lewis X, il a été montré que ces contacts sont complétés par un réseau d'interactions hydrogène et de van der Waals avec les résidus d'acides aminés de la protéine (Glu 347, Asn 349, Glu 354, Asn 365). Ce phénomène peut être étendu aux ligands hautement mannosylés. Ils interagissent non seulement avec les résidus terminaux mais aussi les résidus internes qui s'étirent le long du site actif (cf. Figure 10.B.²³). C'est une caractéristique assez rare chez les lectines de type C, la plupart comme la protéine A, n'interagissent qu'avec le terminal glycosylé de leur ligand, le reste ne touchant pas la protéine.

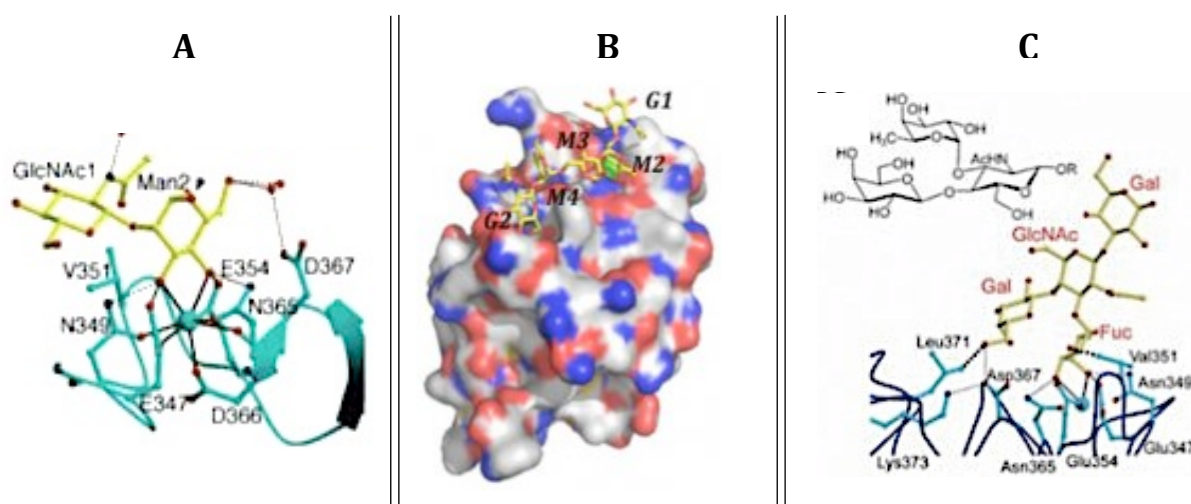


Figure 10 - A. Interaction entre DC-SIGN et un ligand mannosylé ; B. Interaction entre les résidus internes de DC-SIGN et un ligand ; C. Interaction entre DC-SIGN et un ligand fucosylé.

L'affinité glycosidique pour le CRD du DC-SIGN est faible (le K_D est de l'ordre du mM). Cependant l'oligomérisation de la lectine en tétramère et les ligands hautement glycosylés permettent d'avoir une avidité plus importante (K_D de l'ordre du nM) (cf. Figure 11). La multivalence est donc nécessaire dans la reconnaissance des ligands.

D. Les cellules dendritiques et la vaccination

Pour déclencher la réponse immunitaire adaptative, il faut que l'antigène soit en nombre suffisant et qu'il ait assez d'éléments glycosylés sur sa membrane. Il arrive que certains antigènes, comme certaines cellules cancéreuses, puissent agir impunément en

restant en dessous de ce seuil. Ainsi, depuis les années 90, les cellules dendritiques ont été utilisées dans des essais cliniques comme médiateurs cellulaires pour la vaccination de patients atteints de cancer.

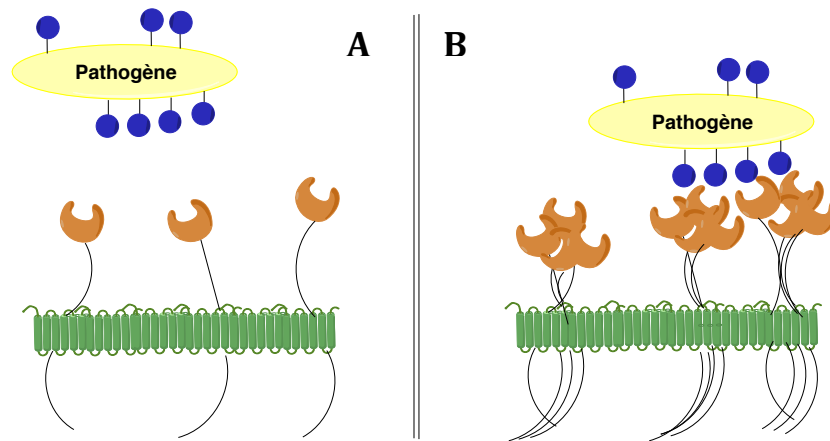


Figure 11 - A. Interaction faible du pathogène avec une lectine de faible densité de population et faiblement exprimée ; B. Interaction forte du pathogène avec une lectine de haute densité de population générée par une surexpression et une oligomérisation.

1. Les cellules dendritiques et les essais cliniques

Les réponses cliniques, basées sur le taux de réponse objectif ont été décevantes, n'excédant que rarement 15%. De nombreux types de cancer ont été ciblés depuis les années 90 mais seulement quatre ont réussi à atteindre la phase III des essais cliniques : le mélanome malin, le cancer de la prostate, les tumeurs gliales malignes et le cancer du rein.

La vaccination basée sur les cellules dendritiques est bien tolérée lorsqu'elle est utilisée en monothérapie. On peut le voir par la rareté des patients utilisant cette méthode développant les grades 3 et 4, respectivement les effets indésirables sévères et mortel d'après les critères communs de terminologie des effets indésirables de l'institut national de cancérologie des Etats-Unis (CTCAE)²⁸.

Les traitements actuels tel que Sunitinib ou Temsirolimus entraînent une chute importante de la qualité de vie des patients tant au niveau physique que moral. En effet, ces traitements provoquant des effets indésirables de grades 3 ou 4 à hauteur de 67% des patients, une surveillance rapprochée et pesante doit être mise en place²⁹. Au contraire, l'absence de toxicité substantielle et l'intervalle d'administration espacé de la vaccination basée sur les cellules dendritiques permettent une qualité de vie maintenue.

Leonhartsberger et al. ont fait l'un des rares rapports sur ce sujet et confirme cela à partir de 55 patients atteints du cancer du rein³⁰.

La réponse immunitaire adaptative est bien enclenchée chez de nombreux patients et ce même pour des cancers avancés pour lesquels on attendait plutôt une réponse immunitaire moins importante avec la vaccination basée sur des cellules dendritiques. D'après l'étude de Draube et al., ce traitement suscitait une réponse immunitaire spécifique chez 77% des patients avec un cancer de la prostate et 61% de ceux avec un cancer du rein²⁸.

Malgré ce pourcentage important, lorsqu'on regarde les indicateurs habituels tels que la réponse objective tumorale, correspondant à la régression ou la non évolution de la tumeur des patients sous traitement, les résultats bien que réels sont faibles et similaires, dans certains cas, aux traitements usuels. Par exemple, 5 à 8 % des patients d'essais cliniques recensés jusqu'en 2014 atteints d'un mélanome malin atteignent une réponse objective tumorale, ce qui est similaire au mélange dacarbazine/ipilimumab (5 à 15%), un traitement standard pour ce type de cancer³¹.

Anguille et al. ont réuni tous les essais cliniques publiés sur les vaccins basés sur les cellules dendritiques pour les quatre types de cancer qui nous préoccupent et pour lesquels le taux global de survie a été calculé³¹. On entend par taux global de survie, la durée entre la date du diagnostic ou du début du traitement et la mort du patient. A part deux essais, on observe une augmentation d'au moins 20% de la médiane du taux global de survie sachant que 20% est la barre usuellement utilisée pour établir une amélioration clinique significative³². Parmi eux, sipuleucel-T (Provenge®, Dendreon, Seattle, WA) est en phase III contre le cancer de la prostate fait passer la médiane du taux global de survie de 21.7 à 25.8 mois soit une amélioration de 4.1 mois. Sur la base de l'avantage de survie malgré le peu de patients ayant une réponse objective (inférieur à 5%), Sipuleucel-T a été la première immunothérapie approuvée par l'US FDA (*United States Food and Drug Administration*) pour le cancer de la prostate et reste la seule depuis 2010^{33, 34}.

Le faible taux de réponse objective montre bien une méconnaissance dans la compréhension de la réponse immunitaire nécessaire pour éliminer le cancer. Il est

indispensable d'étudier ces phénomènes et en parallèle de trouver une meilleure façon d'évaluer l'efficacité des essais cliniques.

2. Préparation des cellules dendritiques *ex vivo* et *in vivo*

Les vaccins basés sur les cellules dendritiques peuvent être préparés de différentes manières. La plupart des essais ont été faits sur des cellules dendritiques autologues auxquelles on aurait introduit *ex vivo* l'antigène de la tumeur ou un dérivé peptidique de celui-ci, et re-administrées aux patients avec ou sans agents chimiothérapeutiques^{35, 36, 37}. Parmi les nombreux exemples, on peut noter celui du Sipuleucel-T, Provenge®, le premier médicament de ce type à avoir eu l'autorisation de l'US FDA. Les cellules dendritiques extraites sont mises en présence d'une protéine de fusion constituée d'un antigène présent dans 95% des cellules cancéreuses de la prostate, la phosphatase acide prostatique, et d'un facteur aidant la maturation des cellules dendritiques, le GM-CSF (*Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor*)³⁸. Ce type de manipulation de cellules dendritiques est limité par certains facteurs, tel que le prix élevé et le temps de fabrication long dû à la personnalisation des traitements. Le traitement mentionné coûte, par exemple, 93 000\$³⁹. Le risque d'infection élevé des patients n'est pas à négliger, c'est l'un des problèmes les plus importants puisque les patients cancéreux peuvent être déjà immuno-compromis et sensibles à diverses infections.

Une alternative, plus directe et moins laborieuse, est la manipulation des cellules dendritiques *in vivo*, c'est-à-dire leur amener directement l'antigène afin de les activer et de les charger de ce dernier. Deux stratégies peuvent être poursuivies : l'interaction avec des ligands naturels d'un récepteur ou l'exploitation d'un anticorps contre un récepteur.

Les anticorps reconnaissent leur cible avec une grande spécificité et affinité, permettant d'éviter la neutralisation du ligand par d'autres types de cellule. L'efficacité du ciblage n'est pas diminuée et n'entraîne pas les effets secondaires sous-jacents. Des essais ont été effectués avec des anticorps contre certains récepteurs d'endocytose des DCs modifiés pour inclure un antigène. Ils ont donné une importante activation des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺, 400 fois supérieure aux pinocytoses habituelles⁴⁰.

Cependant, il est plus difficile de combiner tous les acteurs d'une vaccination basée sur les cellules dendritiques contrairement aux ligands naturels⁴¹.

La manipulation des cellules dendritiques *in vivo* en est encore à ses débuts et n'a pas été expérimenté sur les humains. Néanmoins des exemples prometteurs de vecteurs ont été expérimentés sur des rats comme ceux de Li et al composés soit de nanoparticules de chitosane⁴² soit d'un adénovirus⁴³, auxquels ils ont ajouté une immunotoxine contre un récepteur surexprimé lors de gliomes malins (EphA2), EphrinA1-PE38, et de la GM-CSF.

II. Structures multivalentes

A. Multivalence

La reconnaissance spécifique d'éléments glycosylés par des protéines est essentielle à la régulation de l'activité cellulaire tel que l'endocytose. Malheureusement, l'interaction entre une unité glycosidique et un récepteur est faible ($K_a=10^3\text{-}10^4$ M). Dans les systèmes biologiques, cette faiblesse est contournée par des interactions multivalentes⁴⁴.

1. Définition

Deux phénomènes sont liés à la formation de liaisons non covalentes : la coopérativité et la multivalence. La coopérativité se définit par la dépendance de l'interaction de différents ligands monovalents sur des récepteurs multivalents. Quand on prend l'exemple d'une protéine, l'interaction du premier ligand entraîne une modification de sa conformation rendant l'affinité d'un deuxième ligand pour un autre récepteur plus importante, effet agoniste, ou moins importante, effet antagoniste. Par contre, la multivalence met en jeu des interactions simultanées entre ligands et récepteurs tous deux multivalents⁴⁵.

Dans un premier temps, si on simplifie le problème en prenant un ligand multivalent et un récepteur monovalent, l'interaction entre les deux pourrait être similaire au cas d'un ligand monovalent. Cependant, il a été observé et maintenant admis que, même dans ce cas là, une réassociation statistique peut donner un effet de multivalence et augmenter l'affinité de l'interaction de façon non-négligeable (cf. Figure 12)⁴⁶.

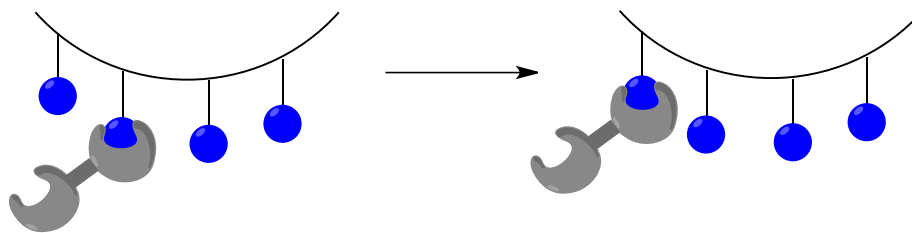


Figure 12 - Principe de réassociation stastique.

Si on regarde ensuite ces interactions dans leur milieu biologique où elles sont au coeur des processus, de nombreux mécanismes d'interactions existent et peuvent se produire simultanément. Ainsi, une meilleure compréhension des différentes contributions individuelles est nécessaire pour comprendre l'effet de multivalence dans sa globalité. Parmi les effets, l'effet poly-électrolytique n'est pas abordé ici.

2. Effet de concentration / Effet statistique

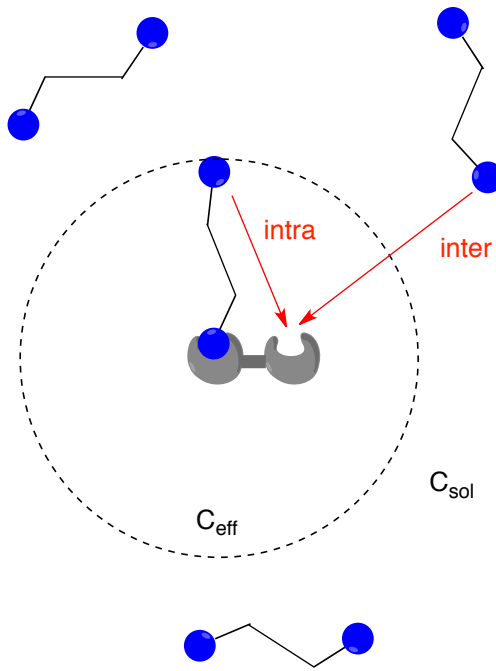
Le concept de concentration effective (C_{eff}) a été proposé il y a près de 60 ans pour expliquer l'effet chélate de complexes métalliques observé alors⁴⁷. Il n'a été appliqué aux interactions multivalentes que plus tard^{48, 49}.

Ce terme est utilisé pour différencier les interactions inter- et intramoléculaires, et prendre en compte la proximité ligand/récepteur dans l'interaction de deux entités connectées chacun par un espaceur. Cela représente donc leur probabilité de rencontre mais aussi une concentration physique réelle d'un des ligands d'une entité par rapport à l'autre entité⁵⁰. La molarité effective est le terme plus général utilisé, représentant le ratio des constantes d'association des processus intra- sur intermoléculaire⁵¹.

La modélisation de l'interaction entre un ligand et un récepteur tous deux bivalents permet de simplifier l'explication (cf. Figure 13).

La première interaction entre les deux éléments est nécessairement intermoléculaire. La deuxième, quant-à-elle, peut être soit intermoléculaire avec un autre ligand soit intramoléculaire (association chélate) avec le second épitope.

Suivant l'espaceur entre les deux épitopes, la concentration locale autour du récepteur, c'est-à-dire la concentration effective, peut être plus ou moins importante que la concentration globale de la solution (C_{sol}).



Si $C_{eff} \ll C_{sol}$, l'association intermoléculaire sera favorisée. C'est le cas pour des espaceurs trop petits pour permettre au second épitope d'atteindre le site de liaison.

Inversement, si $C_{eff} \gg C_{sol}$, la seconde association sera préférentiellement intramoléculaire. En effet, le second épitope est plus proche du second site de liaison via la première interaction, augmentant ainsi leur probabilité de rencontre.

Figure 13 - Principe de l'effet de concentration.

3. L'effet "chélate" / Association chélate

L'association chélate ou effet chélate est l'interaction simultanée de plusieurs épitopes d'un ligand multivalent avec un récepteur grâce à l'orientation semblable entre les deux (cf. Figure 14).

Seule la première interaction (intermoléculaire) coûte de l'entropie translationnelle et rotationnelle, les suivantes, intramoléculaires, en sont exemptes. Cette entropie favorable n'est que partiellement compensée par le coût énergétique dû à la rigidité conformationnelle du ligand multidentate et de l'orientation de chaque épitope, il en résulte un gain d'affinité non-négligeable³⁸.

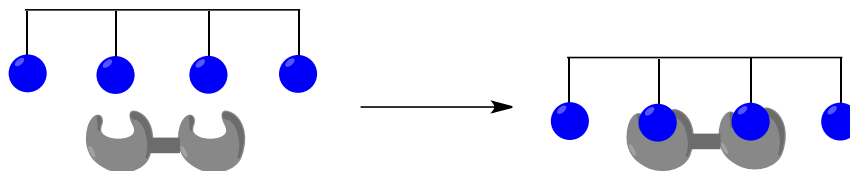


Figure 14 - Principe de " l'effet chélate".

Une variation de cet effet est la présence d'un second site de liaison. Ce site secondaire présente souvent des affinités, ou même des spécificités, différentes.

4. Clustering de récepteurs

L'effet cluster se base sur le fait que les récepteurs sont libres de diffuser le long de la paroi membranaire. Du fait de cette mobilité, lorsqu'un ligand se lie à un récepteur, les autres récepteurs du même type peuvent venir et former un cluster, favorisant ainsi l'interaction avec des ligands supplémentaires (cf. Figure 15)^{52, 53}.

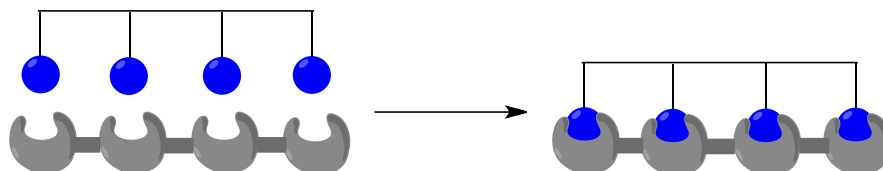


Figure 15 - Principe de clustering de récepteurs.

B. Structures glycosylées multivalentes

Il existe une multitude de structures glycosylées multivalentes synthétiques essayant de recomposer l'importante diversité des architectures naturelles. La structure de ces entités, c'est-à-dire leurs valences (nombre d'éléments glycosylés accrochés), leurs densités et leurs topologies, influence significativement les caractéristiques de l'interaction (affinité et mécanisme) de part leur présentation plus ou moins efficace des motifs terminaux.

Elles peuvent être catégorisées en glycocluster, glycopolymère, glyconanoparticule, et glycodendrimère (cf. Tableau 1). Seulement quelques exemples significatifs seront discutés ici.


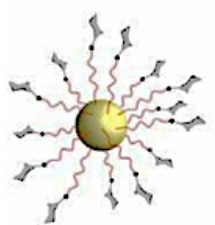

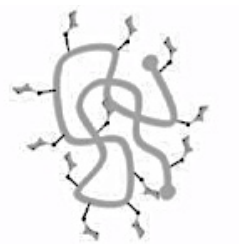


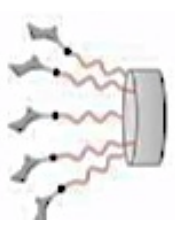


	Glycodendrimer	Valence moyenne	Structure bien définie Unité de répétition	Volume variable
	Glyconanoparticle	Valence 	Structure statistique	Volume variable
	Glycopolymère	Valence 	Structure statistique	Pelote statistique  Volume
	Glycocluster	Valence 	Structure unique	 Volume

Tableau 1 - Différentes catégories de structures glycosylées multivalentes.

1. Glycoclusters

Les glycoclusters sont des structures multivalentes qui ne présentent pas d'unités de répétition. Les éléments glycosylés sont accrochés sur des molécules multifonctionnelles formant ainsi le coeur.

Parmi ces structures, les cyclodextrines^{54, 55, 56} et les calixarènes^{57, 58, 59, 60} ont été très exploitées du fait de la variabilité de la taille de leur cycle et de la possibilité de l'inclusion de molécules organique dans leurs cavités.

Les cyclodextrines, sont des oligosaccharides cycliques constitués de six, sept ou huit unités de α -1,4-D-glucopyranoside appelés respectivement α , β , γ (cf. Figure 16). Les hydroxy de la cyclodextrine ont des réactivités différentes (les alcools primaires et les hydroxy placés en 2 et 3), faisant pointer dans des directions différentes les molécules liées à eux, formant ainsi deux faces. Un exemple donné par Fulton et al. est la photoaddition d'une per-2,6-diallyl- β -cyclodextrine avec du β -D-thioglucose pour donner un glycocluster avec 70% de rendement (cf. Figure 17).

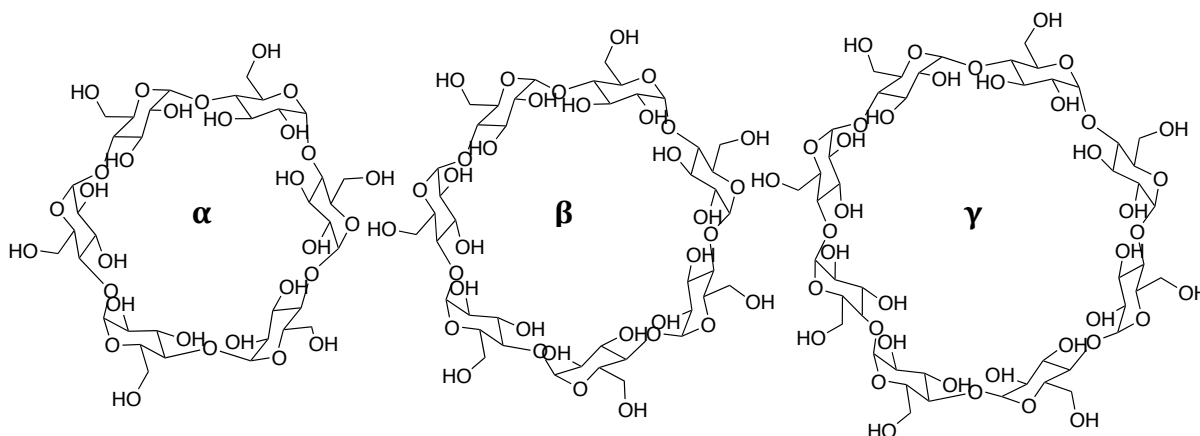


Figure 16 - Différentes cyclodextrines : α , β , γ .

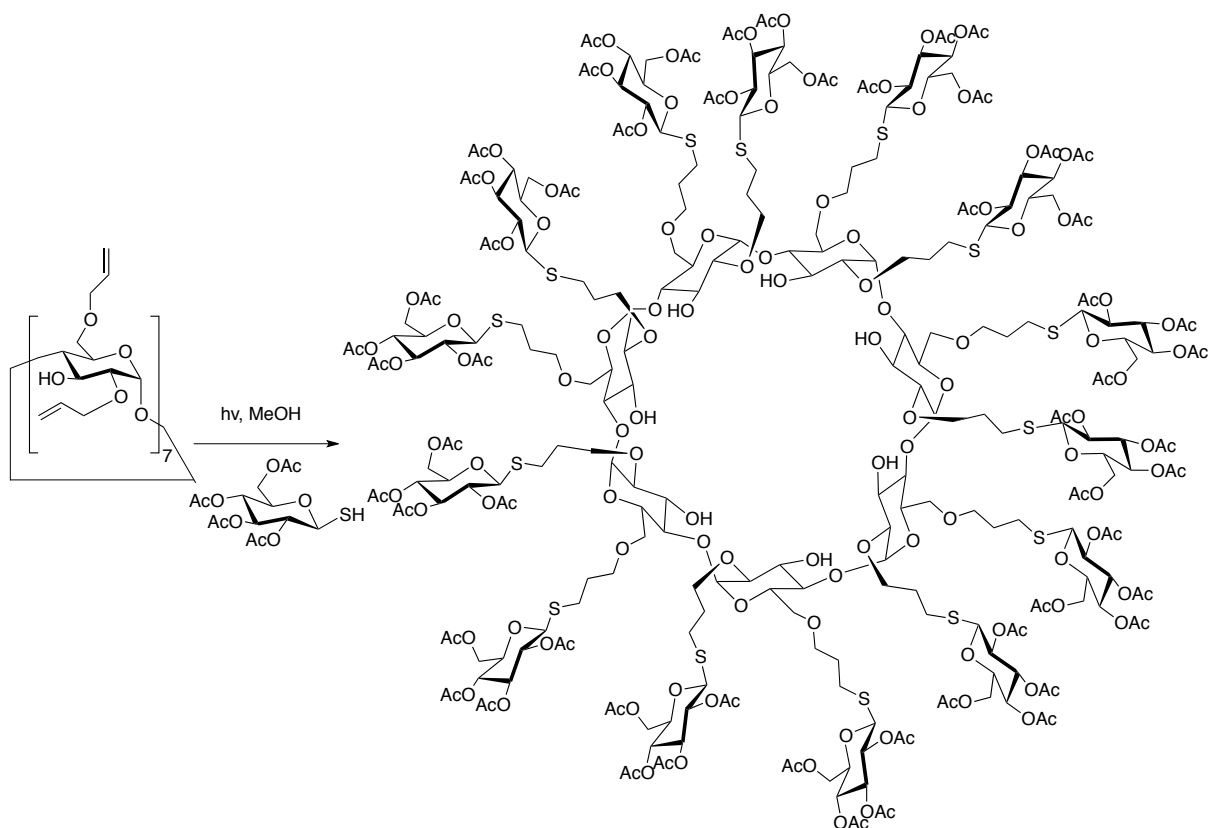


Figure 17 - Photoaddition d'une per-2,6-diallyl- β -cyclodextrine.

Les calixarènes, quant-à-elles, sont généralement constituées de quatre, six ou huit unités benzéniques cycliques mais elles peuvent être plus grandes⁶¹. Ils existent différentes configurations par calixarène, l'exemple de celui à 4 unités est représenté en Figure 18, il comporte le cône, le cône partiel, le 1,2-alterné et le 1,3-alterné. La calix-[6]-arène de Vidal et al. est un bon exemple de ce type de glycocluster : elle a permis d'introduire des éléments saccharidiques via des bras espaceurs d'éthylène glycol (cf. Figure 19)⁶².

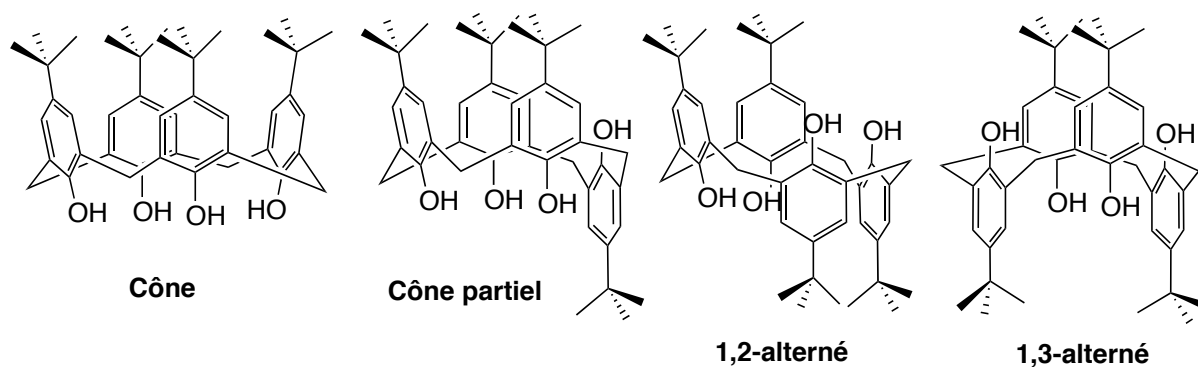


Figure 18 - Différentes calixarènes : Cône, cône partiel, 1,2-alterné et 1,3-alterné.

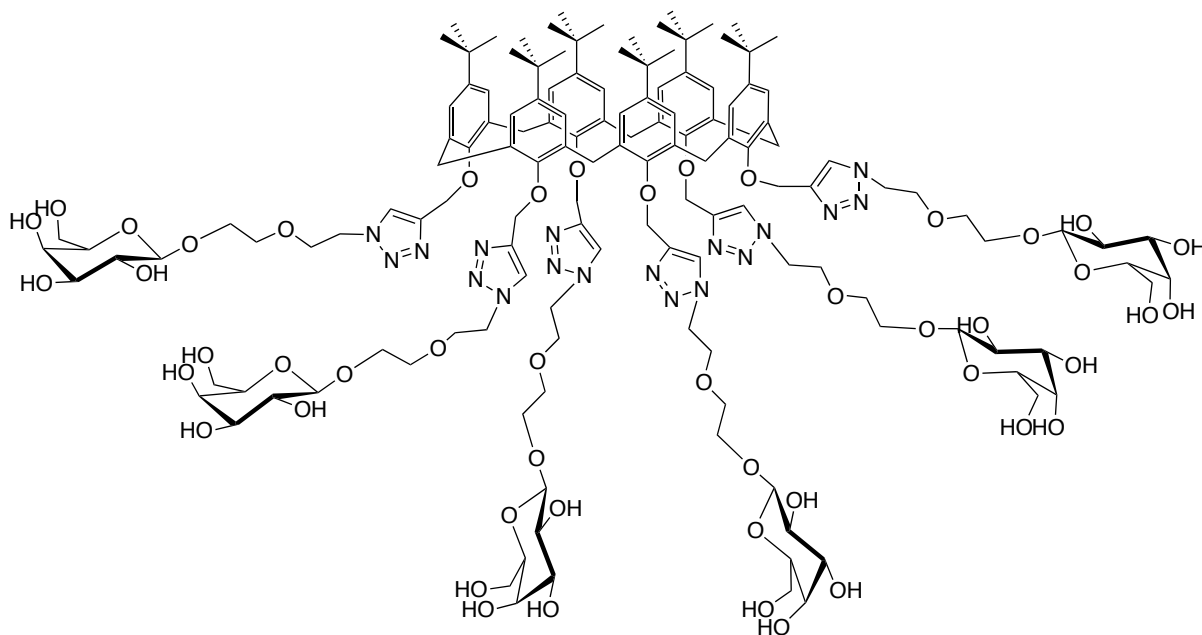


Figure 19 - Glycluster développé par Vidal et al..

Les cyclopeptides sont aussi très utilisés comme structures multivalentes^{63, 64}. Bossu et al. a synthétisé de nombreux glyclusters grâce à des cyclisations de peptides comportant un certain nombre de lysines protégées, dans son cas 4 ou 6⁶⁵. Ces acides aminés sont déprotégés puis fonctionnalisés par des sérines protégés. Leur déprotection permet d'avoir les fonctions aminoalcools qui seront oxydées en aldéhyde grâce à du périodate de sodium (NaIO_4). S'ensuit une ligation oxime avec des résidus oxyamines afin de donner différents glyclusters avec des rendements allant de 65 à 80% (cf. Figure 20 pour un glycluster mannosylé).

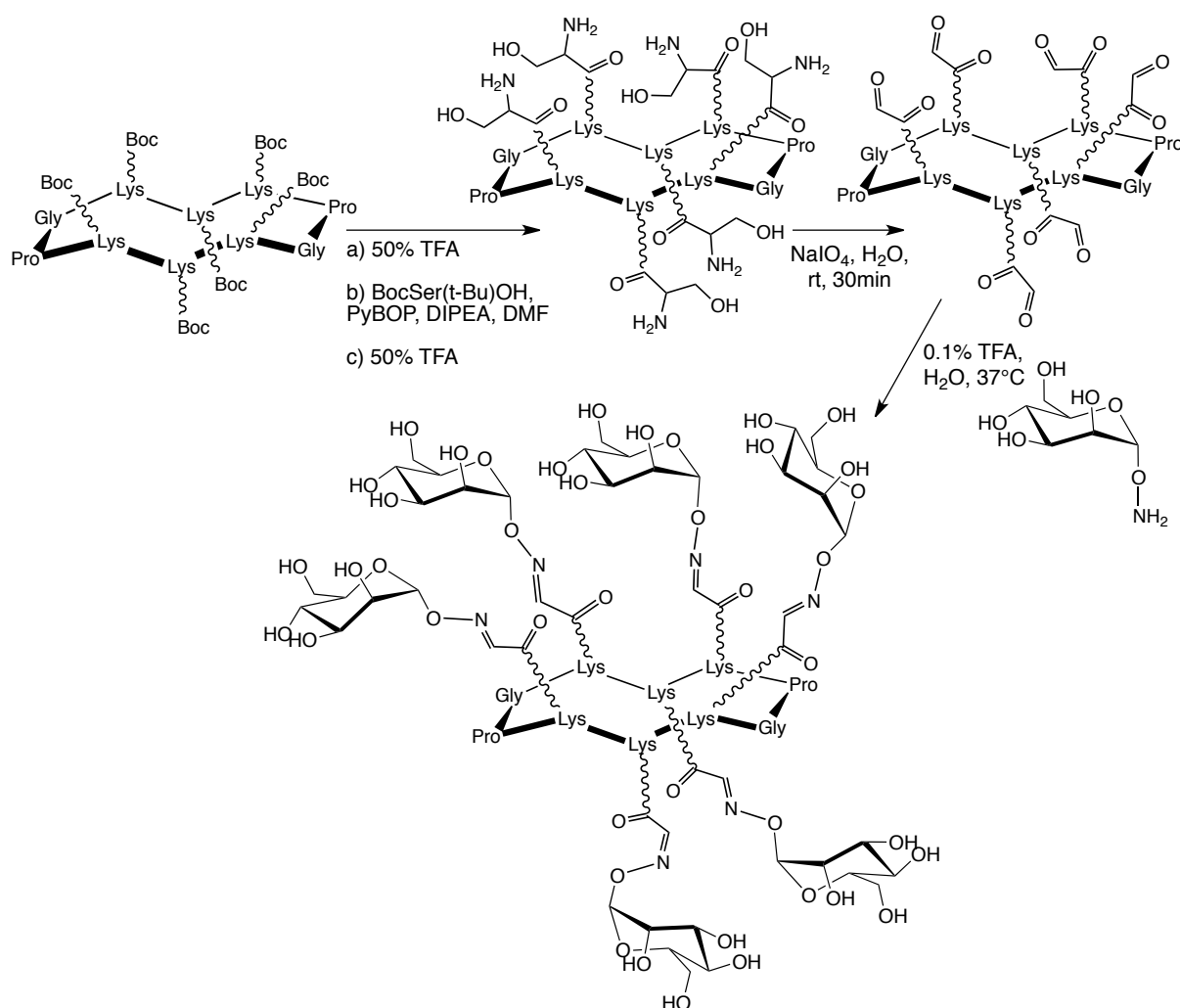


Figure 20 - Exemple de glycocluster mannosylé synthétisé par Bossu et al..

2. Glycopolymères

Les glycopolymères sont des polymères auxquels sont accrochés des éléments glycosylés. Malgré un contrôle de la taille des entités via le ratio monomère/catalyseur, leur distribution reste statistique. Plus le polymère a une masse importante, plus il est difficile à purifier et à analyser par MALDI. Sans cette masse exacte, le manque de reproductibilité limite l'application thérapeutique de ce type de structure.

Ces molécules peuvent être polymérisées par différents procédés et sont souvent catégorisées grâce à cela^{66,67}. En voici quelques unes :

- la Polymérisation par Ouverture de Cycle (ROP) dont celle par métathèse (ROMP - *Ring-Opening Metathesis Polymerization*), et

- la CLRP (*Controlled/Living free-Radical Polymerization*), c'est-à-dire :
 - la Polymérisation contrôlée par les nitroxydes,
 - la Polymérisation Radicalaire contrôlée par Transfert d'Atome (ATRP), utilisant une catalyse avec un métal de transition qui fournit un équilibre entre une forme active propageante et une forme dormante favorisée du polymère réduisant les réactions secondaires, et
 - la Polymérisation Radicalaire contrôlée par Transfert de chaîne Réversible par Addition-Fragmentation (RAFT), utilisant des agents de transfert de type thiocarbonylthio.

Deux manières de fonctionnalisation existent : soit avant la polymérisation en passant par la synthèse d'un glycomonomère^{68, 69} soit après^{70, 71, 72, 73}. Contrairement à ce dernier, les glycomonomères permettent une architecture mieux définie avec l'assurance que tous les monomères comporteront un élément saccharidique, ainsi aucun problème de gêne stérique ne sera rencontrée^{74, 75}. Néanmoins, les glycopolymères formés seront moins faciles à caractériser structurellement en fin de polymérisation.

La polymérisation de type ROMP grâce à un bicycle insaturé a été très développée depuis le développement de la métathèse et des catalyseurs de Grubbs. Parmi les multiples exemples, Okoth et al. ont polymérisé l'ester de *N*-hydroxysuccinimide de l'acide bicyclo[2.2.1]hept-5-ene-2-carboxylique en utilisant un catalyseur de Grubbs de troisième génération. S'ensuit l'accrochage du lien amine-azoture et une cycloaddition azoture-alcyne catalysée par du cuivre (CuAAC) avec un sucre propargylé pour donner le glycopolymère représenté en Figure 21⁷⁶.

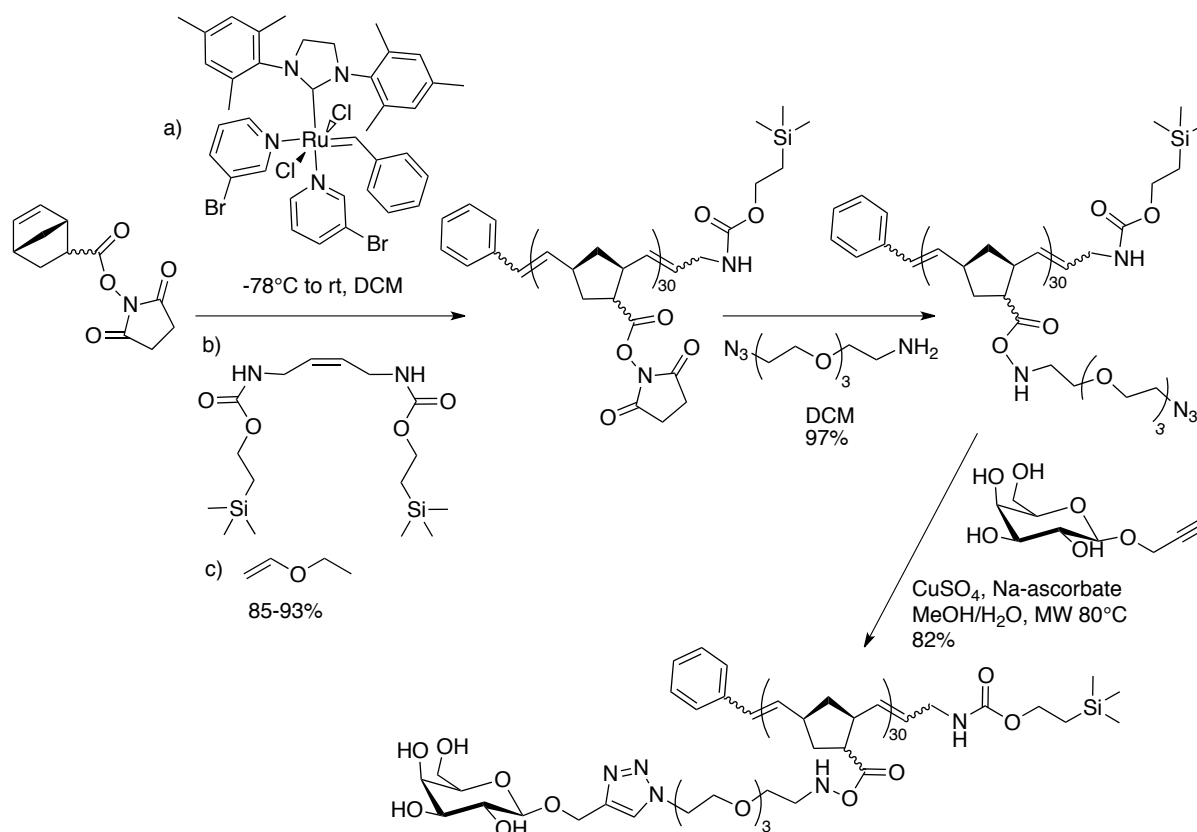


Figure 21 - Schéma de synthèse d'un glycopolymère synthétisé par Okoth et al..

Tanaka et al. ont synthétisé plusieurs glycomonomères suivant la méthode "d'activation de Shoda" précédemment inventée par le même groupe de recherche⁷⁷. Cette méthode utilise du chlorure de 2-chloro-1,3-diméthylimidazolium dans une solution aqueuse basique pour activer directement l'hydroxyle en position anomérique sans avoir à protéger préalablement le saccharide. Cette sélectivité est due au pKa plus faible du groupement hydroxyle de l'hémiacétal anomérique comparé aux autres groupes hydroxyles^{78, 79, 80}. S'ensuit l'attaque nucléophile de l'azoture de sodium. Une CuAAC avec une acrylamide propargylée intervient juste avant la polymérisation par RAFT en présence d'un initiateur, le 2,2'-azobis(4-methoxy-2,4-dimethylvaleronitrile) (V-70), et d'un agent de transfert de chaîne de type thiocarbonylthio, le 2-benzyl sulfanylthiocarbonylsulfanyl éthanol et de l'acrylamide pour former le glycopolymère. Le schéma de synthèse est

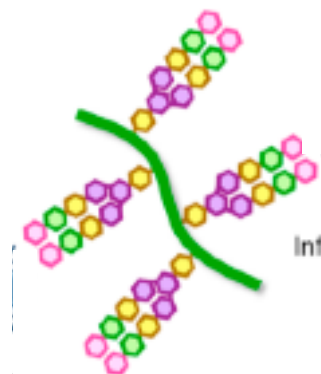


Figure 22 - Représentation d'un des glycopolymères synthétisés par Tanaka et al..

représenté en Figure 23 pour deux exemples de saccharides : du lactose et un *N*-glycan. Un pourcentage de 7.2% de la partie saccharidique a pu être insérée. Une représentation du glycopolymère final est montrée en Figure 22⁷⁷.

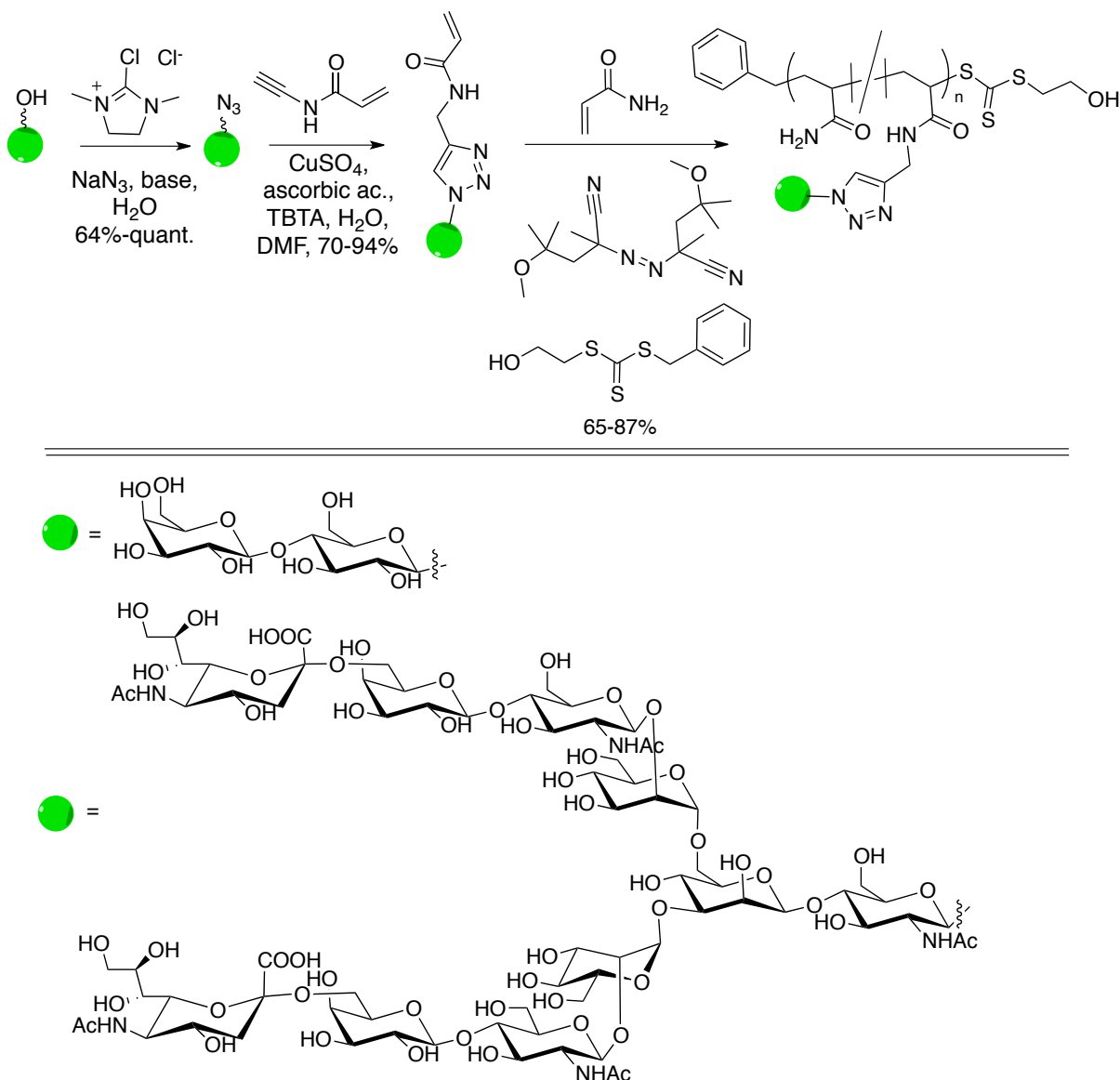


Figure 23 - Glycopolymères synthétisés par Tanaka et al.

3. Glyconanoparticules (GNP)

Les glyconanoparticules sont des éléments glycosylés immobilisés sur une particule inorganique de taille nanométrique. Elles forment une glycocalyx synthétique définie chimiquement avec une forme globulaire. Les structures peuvent être repérées

par leur bande d'absorption caractéristique : 521 nm pour celles en or et 420 nm pour celles en argent.

Les nanoparticules d'or^{81, 82, 83, 84, 85, 86, 87} sont les plus utilisées. L'application des nanoparticules à ce domaine date seulement de 2001 avec la fonctionnalisation par de la Fuente et al. de nanoparticules d'or avec des glycoconjugués d'intérêt biologique, le disaccharide de lactose ou le trisaccharide Lewis X⁸⁸. Ces structures ont assemblé une centaine de résidus glycosylés sur une particule de 2 nm sous forme globulaire.

La méthode de fabrication de ces objets est toujours d'actualité : en présence de glycoconjugués thiolés, du sel d'or (HAuCl_4) est réduit soit par du tétrahydruoborate de sodium (NaBH_4)⁸⁹, méthode directe, soit par du citrate de sodium/perchlorate de sodium chauffé⁹⁰. La taille, l'aspect et la composition des GNP peuvent être ajustés en ajoutant des thiols non conjugués tout en restant dans des données statistiques. Des propriétés peuvent être ajoutées en additionnant des ligands thiolés tel que des molécules fluorescentes. On peut directement utiliser les éléments saccharidiques dans une solution d'amidon en ajoutant de la soude pour être en présence d'ion AuCl^{4-} . Cette espèce oxydera l'élément saccharidique, réduit préalablement par le NaBH_4 , en l'acide carboxylique correspondant⁹¹.

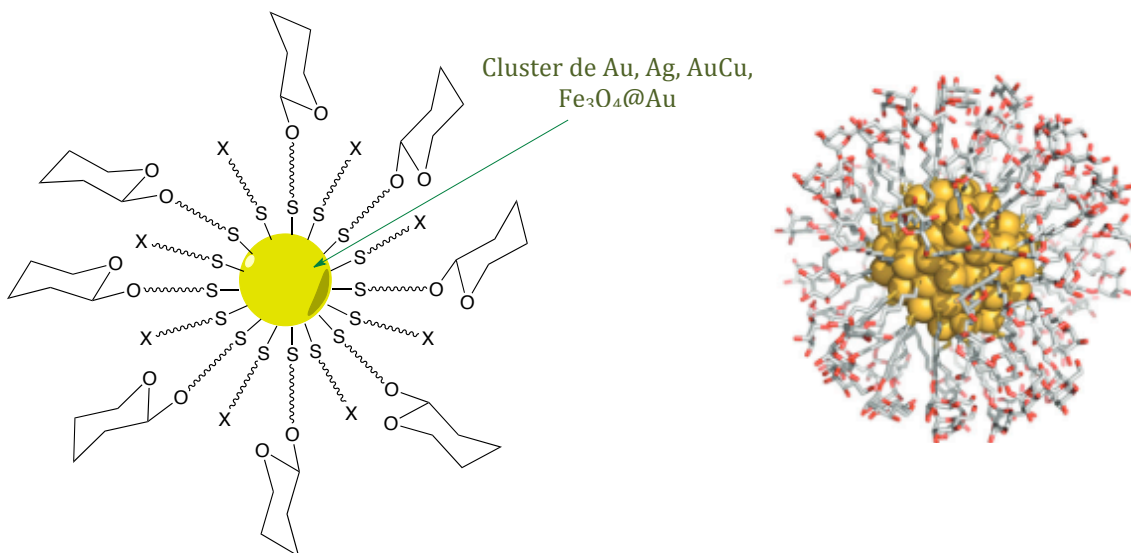


Figure 24 - SAM (*self-assembled monolayer*) d'oligosaccharides thiolés sur des nanoparticules de différente sorte (X= peptides, protéines, anticorps, sondes fluorescentes, complexes de Gadolinium).

La nature de la nanoparticule peut être modifiée pour obtenir des glyconanoparticules ayant des propriétés différentes comme semi-conductrices et magnétiques. Ainsi, il existe des glyconanoparticules d'argent ^{92, 93, 94, ,} de Fe_3O_4 recouvert d'or (désigné sous la forme $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$)⁹⁵, de $\text{MnFe}_2\text{O}_4@\text{Au}$ ⁹⁵, de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Fe}_2\text{O}_3$ (cf. Figure 24)^{96, 97, 98} Parmi elles, on peut noter celle d'Eising et al. qui ont greffé deux différents glycoconjugués sur des nanoparticules d'argent par réduction (cf. Figure 25)⁹⁹.

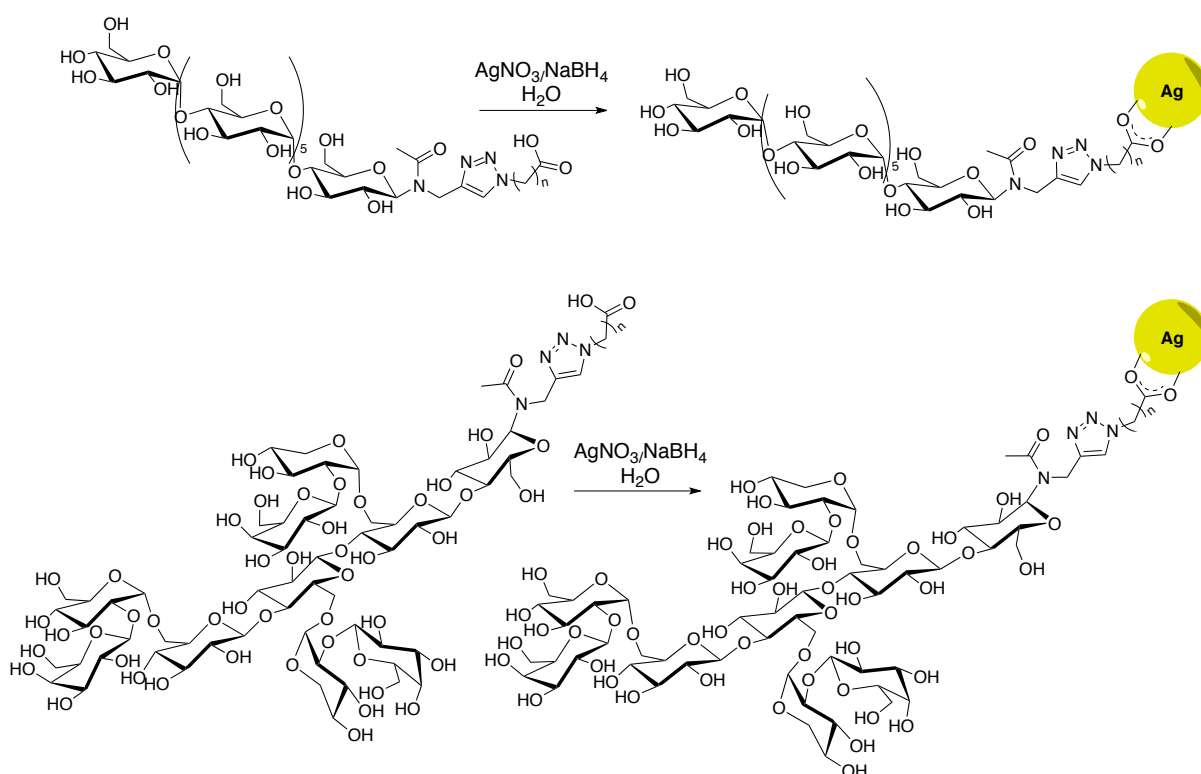


Figure 25 - Glyconanoparticule d'argent synthétisé par Eising et al.

Celles comportant de l'oxyde de fer permettent d'avoir des applications dans l'imagerie par résonance magnétique, le traitement de tumeurs et la vectorisation de médicaments. Le rendement, la taille et la distribution de ces tumeurs sont contrôlés en partie par la manière de les synthétiser (co-précipitation, décomposition thermique, ...) et sont récapitulés par Lu et al.¹⁰⁰.

Du fait de leur manque de monodispersité, les glycopolymères et les glyconanoparticules sont exclues de notre projet. Les glycodendrimères sont les plus appropriés pour avoir une valence importante tout en ayant une structure bien définie. Cette structure sera étudiée plus en détail par la suite.

III. Glycodendrimères

A. Définitions, notions de base

Les dendrimères ont été synthétisés pour la première fois en 1985 par deux groupes indépendants : Tomalia et al.¹⁰¹ et Newkome et al.¹⁰². Depuis ce jour, l'intérêt dans les structures dendritiques n'a fait qu'augmenter.

Les dendrimères sont des structures monodisperses présentant des motifs de répétition. Ils sont bien définis même pour des générations supérieures à 3. Ils sont composés d'un coeur multifonctionnel ayant au moins deux extrémités de branches avec une fonction réactive. Celles-ci serviront à une nouvelle ramification, appelée génération, G_0 représentant le coeur multifonctionnel (cf. Figure 26¹⁰³).

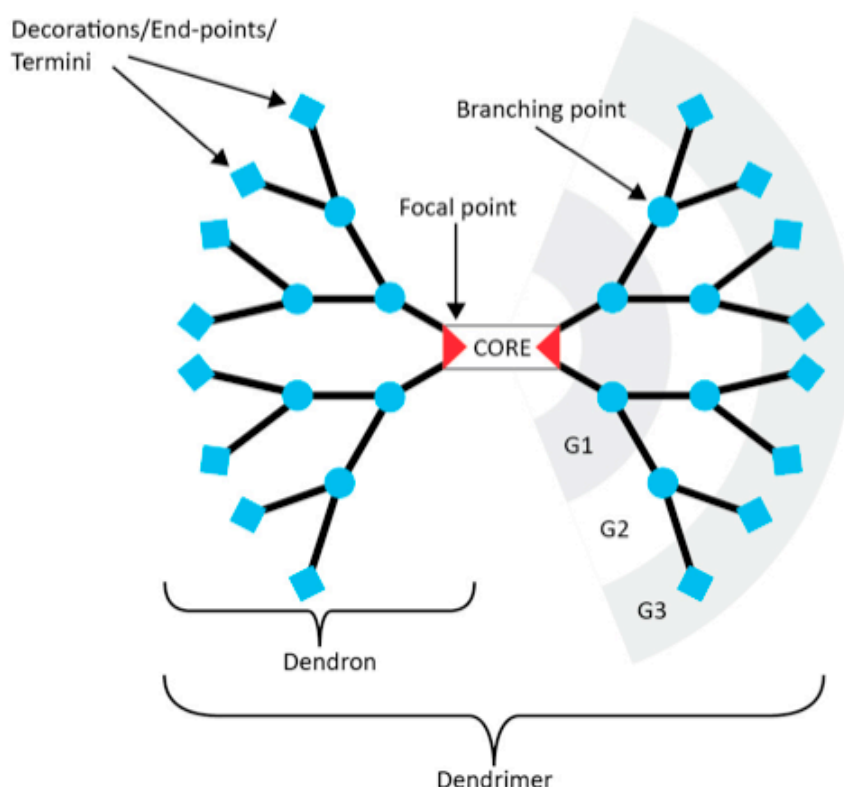


Figure 26 - Structure d'un dendrimère.

Les motifs de répétitions partant de ce coeur sont appelés dendron. Leur structure globale rappelle un arbre d'où leur nom d'origine grecque "dendr".

Les glycodendrimères sont les structures analogues comportant des éléments glycosylés.

1. Synthèse divergente/Synthèse convergente

Deux stratégies peuvent être poursuivies lors de la synthèse de glycodendrimères.

La synthèse divergente (cf. Figure 27), correspond à la construction d'un glycodendrimère à partir du coeur jusqu'aux extrémités. La purification est assez compliquée du fait des délétions multiples qui peuvent se produire. Plus la génération est importante, plus la gêne stérique peut empêcher le couplage des générations suivantes, ainsi une purification est nécessaire à chaque génération afin de vérifier l'intégrité du produit.

Cette technique permet d'essayer d'aller rapidement au maximum des générations possibles.

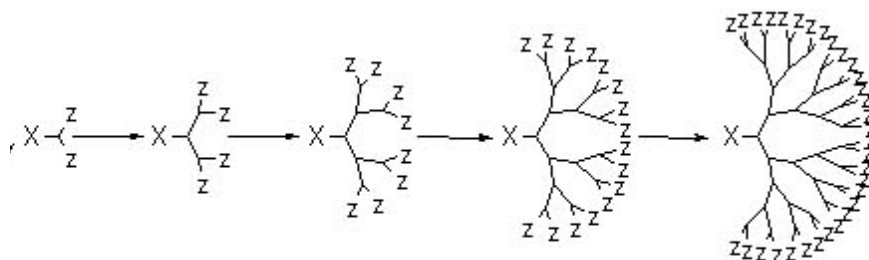


Figure 27 - Schématisation du principe de synthèse divergente de dendrimère, du coeur à la surface (X=coeur du dendrimère et Z= surface du dendrimère).

La synthèse convergente (cf. Figure 28), quant-à-elle, correspond à la construction d'un glycodendrimère en partant des dendrons le constituant vers le coeur. Elle a été développée par Hawker et al. pour permettre une purification et une caractérisation plus facile de chaque dendron¹⁰⁴. Cependant, de la gêne stérique peut intervenir lors de la synthèse du dendron ou du couplage final avec le coeur, ainsi un bon compromis de la génération voulue par rapport à la gêne stérique engendrée doit être fait pour éviter une perte importante de produit et de temps.

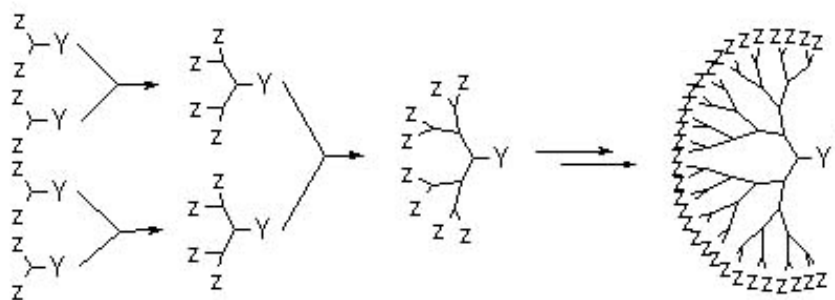


Figure 28 - Schématisation du principe de synthèse convergente de dendrimère, des dendrons vers le coeur (Y= point focal et Z= surface du dendrimère).

2. Composition

Les glycodendrimères peuvent être divisés en 3 catégories suivant la place de leurs éléments saccharidiques : soit au coeur du dendrimère (cf. Figure 29.A.), soit au coeur et sur l'enveloppe de celui-ci (cf. Figure 29.B.), soit seulement sur son enveloppe (cf. Figure 29.C.).

Les structures dendritiques du premier cas ne possédant pas d'éléments saccharidiques sur leurs enveloppes, ne sont pas aptes à l'étude des interactions multivalentes et donc ne seront pas développées ici.

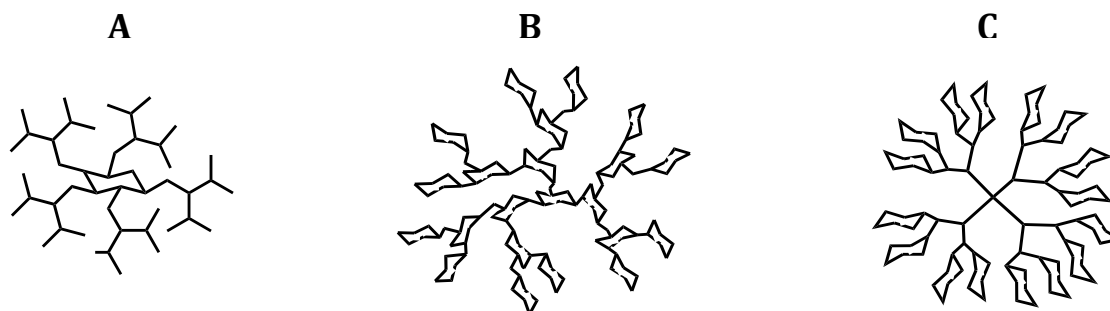


Figure 29 - Les trois catégories de glycodendrimères : A. les glycodendrimères avec un coeur glycosylé ; B. Les dendrimères basés deulement sur des éléments glycosylés et C. les dendrimères n'ayant qu'une enveloppe glycosylée.

B. Glycodendrimères entièrement basés sur des éléments glycosylés

Les éléments glycosylés offrent une information 3D importante due à la chiralité de presque tous les carbones. La diversité de telles structures a été calculée par Laine et al. grâce à un exemple de 6 éléments de bases, soit 6 acides aminés, soit 6 monosaccharides¹⁰⁵. Il a constaté qu'il existait plus de 1.05×10^{12} possibilités d'hexasaccharides branchés tandis qu'il y avait près de 108 fois moins d'hexapeptides possibles.

1. Glycodendrimères à base d'éléments glycosylés construits par glycosylation

La glycosylation semble le moyen le plus puriste de construire un dendrimère entièrement composé d'éléments glycosylés. La glycosylation directe de tous les hydroxyles adjacents d'un monosaccharide n'est pas possible, généralement un bras espaceur de deux ou trois carbones au minimum est ajouté. La première structure remarquable est le glucoside appelé "octopus" de Lindhorst et al. du fait de son design imitant des tentacules^{106, 107}. L'étape clef consiste en une per-allylation et une per-hydroboration du glucoside avant de le per-glycosyler. Différentes structures ont été synthétisées avec de bons rendements, allant de 64 à 86%. La méthode est explicitée sur l'exemple d'un allyl α -D-glucose en Figure 31.

Chaque glycosylation demande une certaine optimisation, ce qui peut être acceptable pour des générations peu importantes mais devient de plus en plus critique lors de l'augmentation de celles-ci. Un des points clefs d'une glycosylation est le choix du donneur. Un exemple assez éloquent est que le simple changement du trichloroacétimide (cf. molécule I sur la Figure 31) en un donneur armé thioglycoside (cf. Figure 30), supposé plus réactif par Wang et al., a fait chuter le rendement à 9% de la glycosylation quantitative vue précédemment¹⁰⁸.

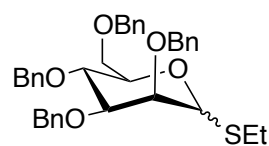


Figure 30 - Donneur utilisé par Wang et al..

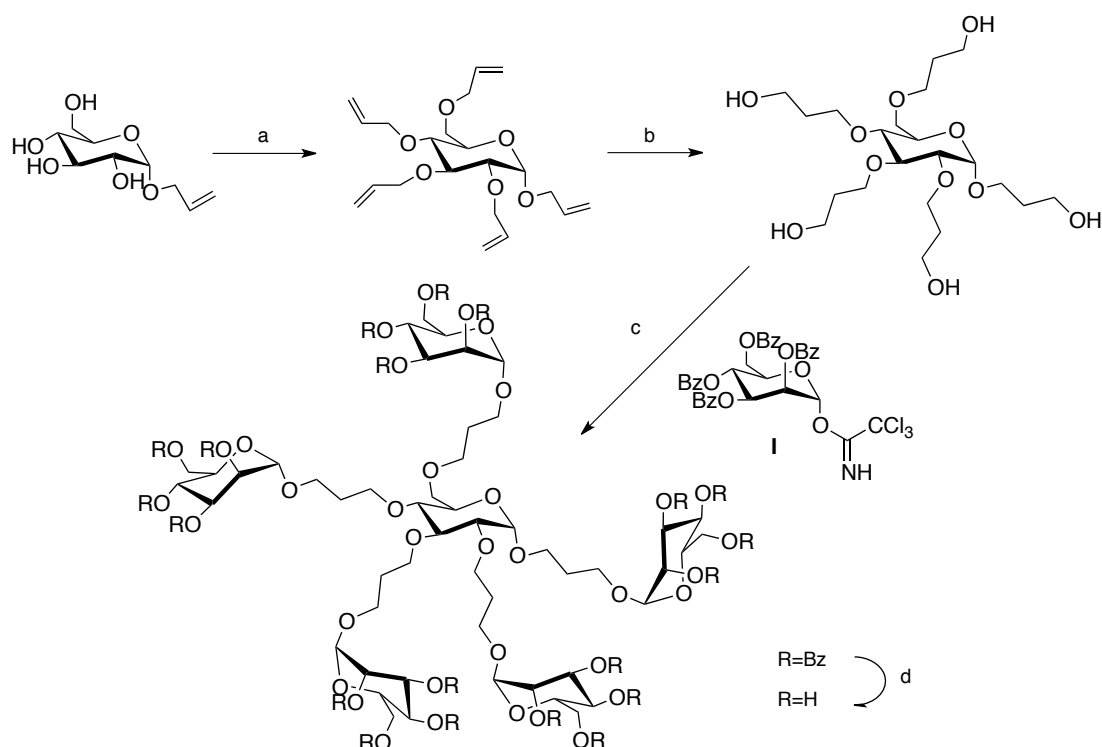


Figure 31 - Synthèse de l'octopus de Lindhorst, basé sur un allyl α -D-glucose - a : TBABr, NaOH 30%, allyl chloride, 72% ; b : i. 9-BBN, THF, ii. NaOH, H_2O_2 , 97%, c : TMSOTf, DCM, quant ; d : NaOMe, MeOH, 82%.

Bien que le concept d'octopus permettait d'atteindre une valence importante rapidement, il est difficilement exploitable pour des dendrimères de génération supérieure à 2. L'utilisation d'un nombre restreint des positions du monosaccharide est alors naturellement poursuivie. Colonna et al. ont ainsi décrit la préparation d'un dendrimer de valence 12 de manière convergente (cf. Figure 32)¹⁰⁹. Deux séries de deux glycosylations faites en position 3 et 6 de l'accepteur ont donné le dendron de génération 1 trisaccharidique puis celui de génération 2 heptasaccharidique recherché. Un espaceur portant une fonction amine est prévu sur ce dernier pour permettre son accrochage final au coeur du dendrimer, le *N,N,N'*-Tris(carboxyméthyl)-1,3,5-benzenetricarboxamide.

Aux problèmes déjà soulevés par les étapes de glycosylation dans la synthèse de glycodendrimères, s'ajoute celui de l'utilisation intensive de groupements protecteurs nécessaires pour obtenir la régio- et stéréosélectivité recherchées. En effet, sur des molécules de génération importante, la complète protection/déprotection et glycosylation de toutes les fonctions est difficile à terminer. La gêne stérique se fait de

plus en plus importante, amenant des problèmes dans le choix des conditions de réaction de la glycosylation et des purifications nécessaires et difficiles à chaque étape. Le nombre d'étapes n'est pas négligeable et pousse à chercher d'autres méthodes de synthèse de glycodendrimères.

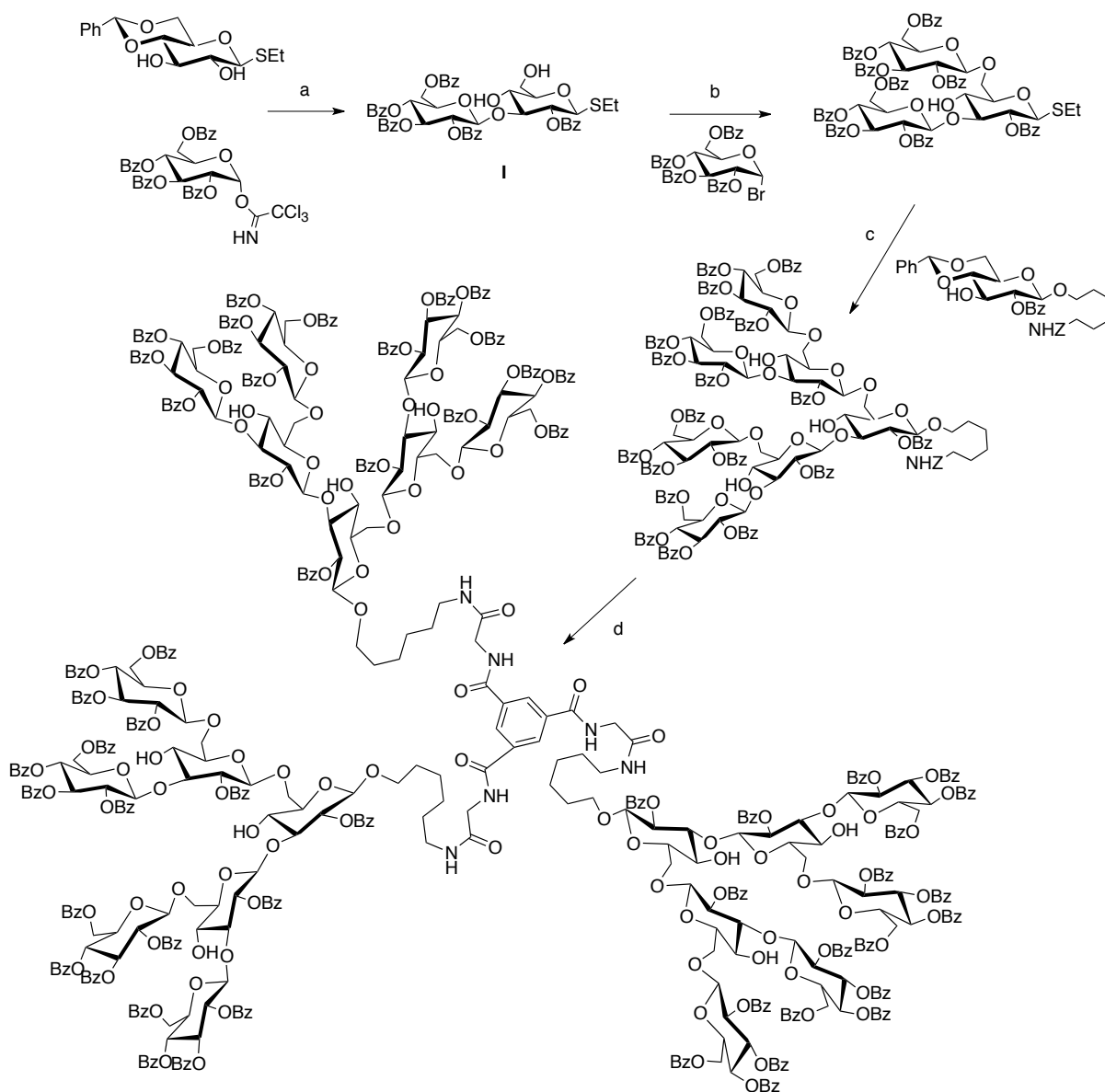


Figure 32 - Synthèse d'un glycodendrimère avec trois branches heptasaccharidiques - a : i. TMSOTf, DCM, 4A mol. sieves, 63%, ii. BzCl, C₅H₅N, 98%, iii. TFA, DCM, 80% ; b : AgOTf, 4A mol. sieves, DCM, 79% ; c : i. I, TfOH, NIS, 39%, ii. TFA, DCM, 61%, iii. 12, TfOH, NIS, 28%, iv. H₂, 10% Pd/C, MeOH/DCM, 20% ; d : N,N',N''-Tris(carboxyméthyl)-1,3,5-benzenetricarboxamide, DCC, HOBT, DCM/DMF, 8%.

2. Glycodendrimères à base d'éléments glycosylés construits par couplage peptidique

Le lien inter-glycosidique structurant le glycodendrimère peut être substitué par un peptidique. Lindhorst et al. ont proposé un système de bloc constructeur saccharidique de type AB₂ qui laisse une position libre pour de futures modifications¹¹⁰. Ce bloc repose sur la modification sélective de deux positions d'un monosaccharide, la position anomérique et l'hydroxyle primaire, et leurs protections orthogonales.

Plusieurs exemples ont été exécutés par ce groupe de recherche^{111, 112}. La position anomérique d'un acide glucuronique acétylé est substituée par un groupement azoturé tandis que la position hydroxyle primaire est couplée avec un aminotriester commercial. Une réaction de Staudinger modifiée suivit d'un couplage peptidique avec différents acides aminés protégés par des groupements *N*- fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) donne le bloc constructeur (cf. Figure 33).

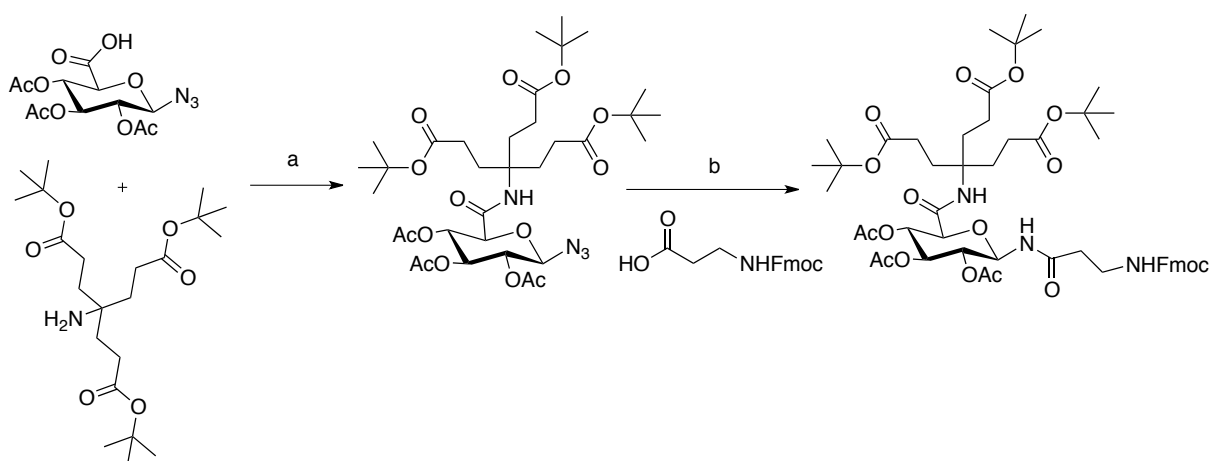


Figure 33 - Synthèse d'un monomère de glycopeptidodendron - a : DIC, HOBt, DCM, 12h, 53% ; b : DIC, HOBt, PMe₃, THF, 0°C-rt, 12h, 68%.

Le groupement tert-butyle est facilement clivable par l'acide trifluoroacétique (TFA) et purifiable par phase inverse sur HPLC pour donner le tri-acide carboxylique. Celui-ci est soit couplé avec le monosaccharide final pour donner la génération 0, soit avec le bloc constructeur préalablement déprotégé du Fmoc puis avec le monosaccharide final pour donner la génération 1 (cf. Figure 34).

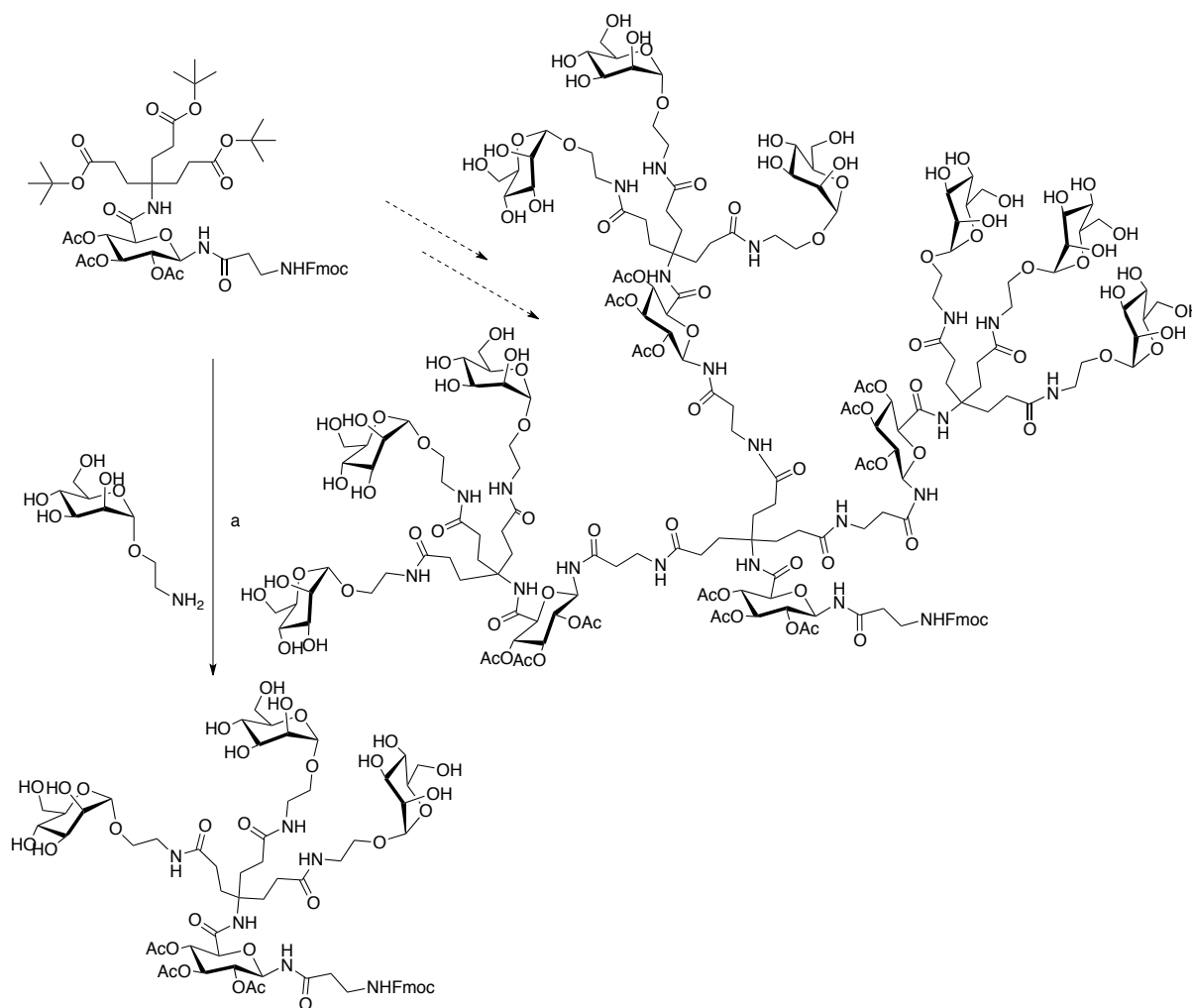


Figure 34 - Synthèse de la génération G₀ et G₁ du glycopeptidodendron - a : i. TFA, C₂H₄Cl₂, 3h, 79%, ii. HATU, DIPEA, DMF, 6h, 50%.

C. Glycodendrimères enveloppés d'éléments glycosylés

La structure glycodendrimérique la plus répandue est celle comportant des éléments saccharidiques seulement sur son enveloppe. Il existe des structures assez particulières dont certaines commercialement disponibles.

1. Glycodendrimères basés sur le Poly(amidoamine) (PAMAM)

PAMAM est l'une des premières structures synthétisées par Tomalia et al.¹⁰¹, sous le nom de Starburst, elle a donné naissance aux dendrimères. Leur utilisation s'est beaucoup développée ces dernières années du fait de sa disponibilité commerciale^{113, 114, 115, 116}. Il existe tout un panel de groupements fonctionnels de surface mais aussi de

coeur alkyl-diamine (2, 4, 6, 12 carbones), bien que l'éthylène diamine soit le plus utilisé et le plus facilement disponible en stock. Les générations en vente vont de 0 (G_0) à 10 (G_{10}) sachant que, par exemple, 5g de PAMAM éthylène diamine en G_2 (valence 16) coûte 644 euros chez Sigma Aldrich¹¹⁷.

La synthèse se fait en deux étapes : une double addition de Michaël entre le coeur et de l'acrylate de méthyle résultant à une demi-génération se terminant par des groupements ester; et un couplage avec la même molécule que le coeur pour finir la génération et obtenir des terminaisons en amines (cf. Figure 35). Ces étapes sont répétées jusqu'à avoir le nombre de générations voulu.

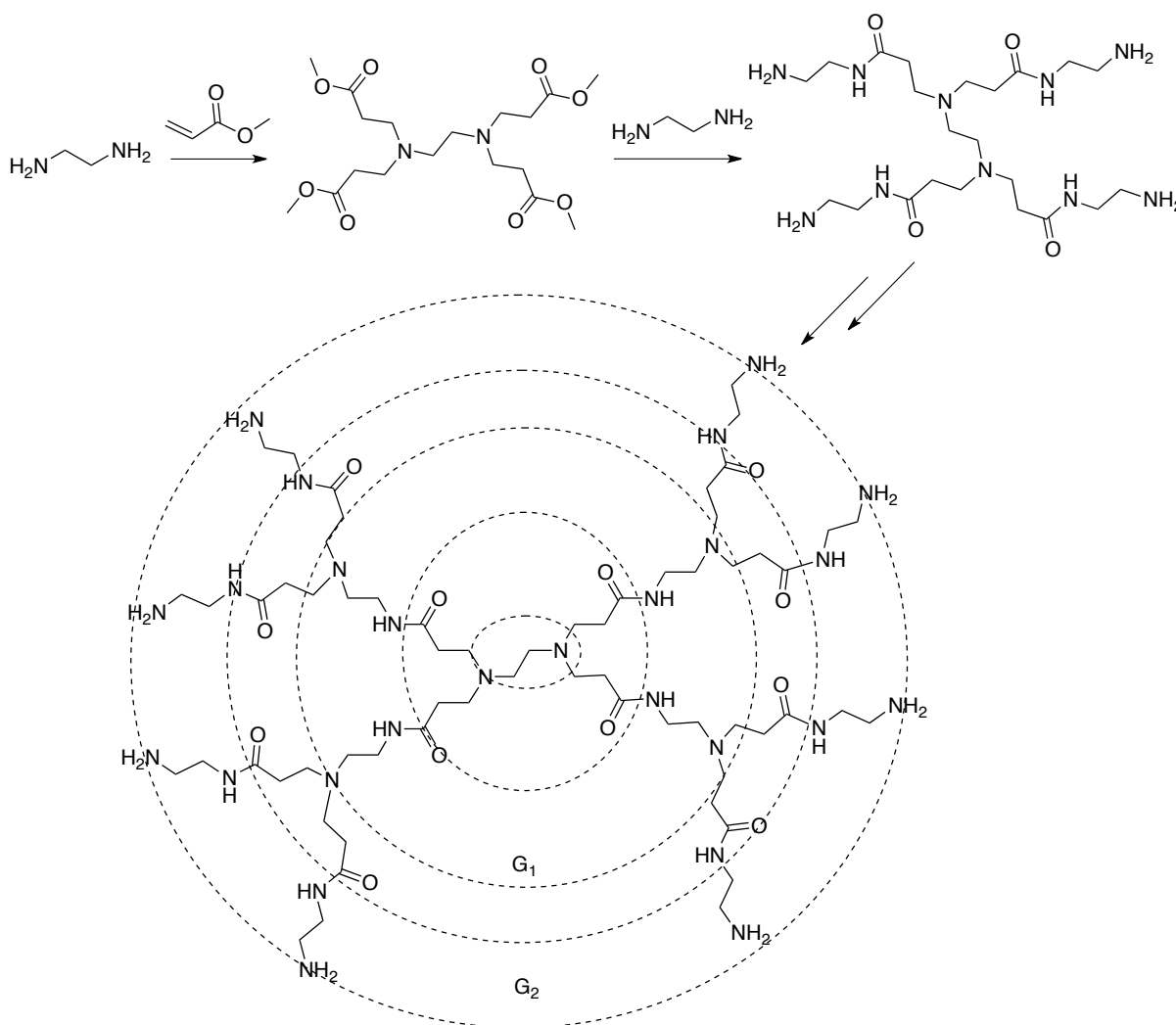


Figure 35 - Synthèse d'un dendrimère PAMAM de génération G_2 .

Parmi les nombreux groupes qui ont exploité cette structure, notons celui auquel appartient Cloninger qui a synthétisé une librairie de glycodendrimères à base de PAMAM de génération 2 à 6 (valence de 16 à 256) en utilisant la chimie des isothiocyanates. Cette librairie utilise la même méthodologie : la modification de l'amine des éléments glycosylés par une fonction isothiocyanate via du thiophosgène, puis l'ajout de ces éléments au PAMAM grâce à ses amines présentes en surface. Le nombre de fonctionnalisation est déduit de la masse molaire moyenne obtenue par MALDI-TOF-MS avant et après désacétylation.

Les premiers essais, faits en 2011, fonctionnalisent les PAMAM par des TRIS-mannoside¹¹⁸ : l'amine d'un TRIS (tris(hydroxyméthyl)aminométhane) est protégé par un groupement tert-butyloxycarbonyl (Boc) pour introduire trois fonctions propargyles, puis déprotégé pour réagir avec du thiophosgène. Des mannoses acétylés et portant un azoture en position anomérique subissent une CuAAC avec ce dernier.

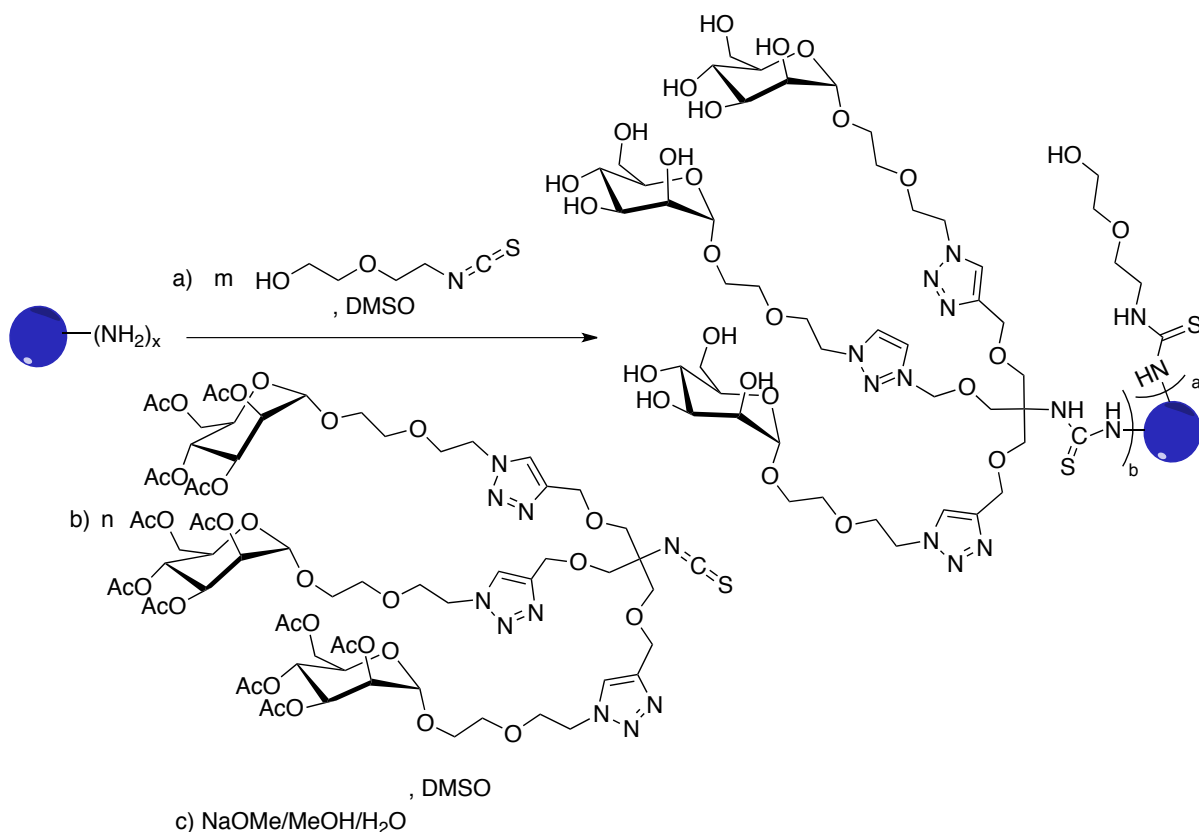


Figure 36 - Fonctionnalisation d'un dendrimère PAMAM par des TRIS-mannoside.

Après quelques essais, du 2-(2-isothiocyanatoethoxy) éthanol a du être ajouté à la fonctionnalisation des glycodendrimères pour faciliter leur solubilité, ceux-ci n'étant

plus soluble en solution tampon aqueuse à partir de la 3^{ème} génération. Ils permettent aussi de bloquer un certain nombre d'amines, diminuant la charge totale du dendrimère et adaptant le pH à l'étude d'interaction de lectine. Au vu de la taille du Tri-mannoside, le 2-(2-isothiocyanatoethoxy) éthanol a d'abord été inséré (cf. Figure 36).

Les ajouts ont été faits l'un après l'autre pour pouvoir calculer le nombre moyen de chaque élément glycosylé par glycodendrimère par MALDI-TOF-MS. D'après les résultats, toutes les fonctions disponibles sur le dendrimère ne réagissent pas (de 15% à 55%) mais cela reste un bon taux de fonctionnalisation.

La multiplication des exemples s'est donc poursuivie en changeant les éléments glycosylés, avec du lactose modifié seul (cf. voie A Figure 37)¹¹⁹, avec un mélange de galactose / lactose (cf. voie B Figure 37)¹²⁰ et avec un mélange de galactose / GalNAc (cf. voie C Figure 37)¹²⁰.

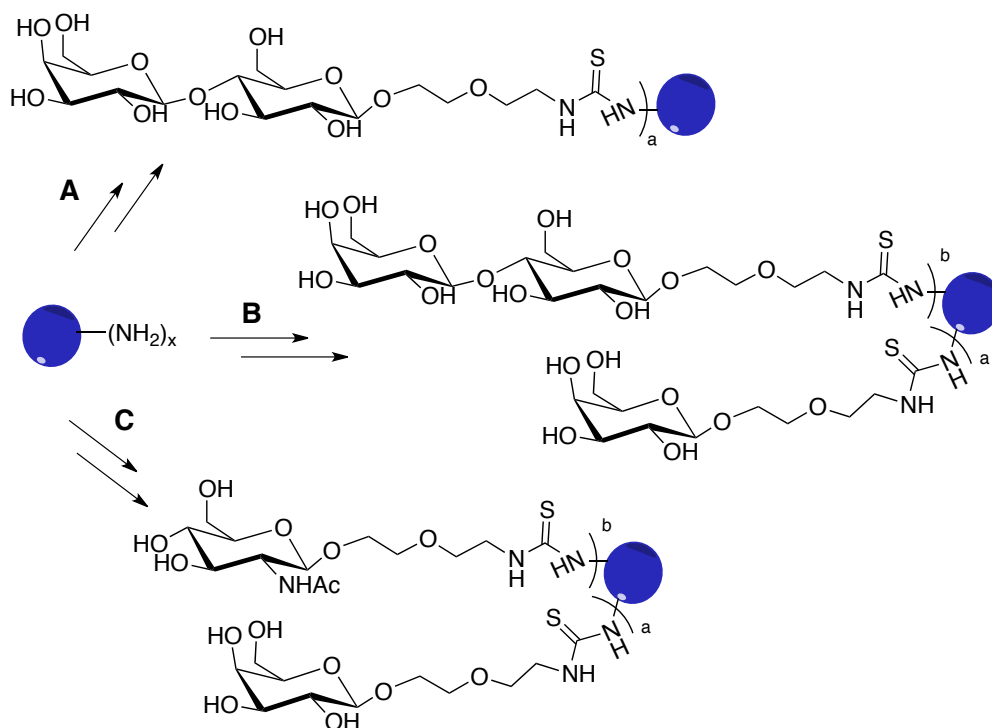


Figure 37 - Exemples de la librairie de glycodendrimères PAMAM développés par Cloninger et al..

2. Glycodendrimères basés sur le Poly(propylène imine) (PPI)

Une structure assez proche du PAMAM, le PPI, a aussi suscité beaucoup d'exemples^{121, 122, 123} : les branchements internes en amidoamine sont remplacés par des amines tertiaires. Ils peuvent être synthétisés en deux étapes : une double addition de Michaël entre de l'acrylonitrile et de l'éthylène diamine, le coeur, résultant à une demi-génération se terminant par des groupements cyano ; et une hydrogénation hétérogène Raney/Cobalt pour finir la génération et obtenir des terminaisons amine (cf. Figure 38). Ces étapes sont réitérées jusqu'à avoir le nombre de générations voulue¹²⁴.

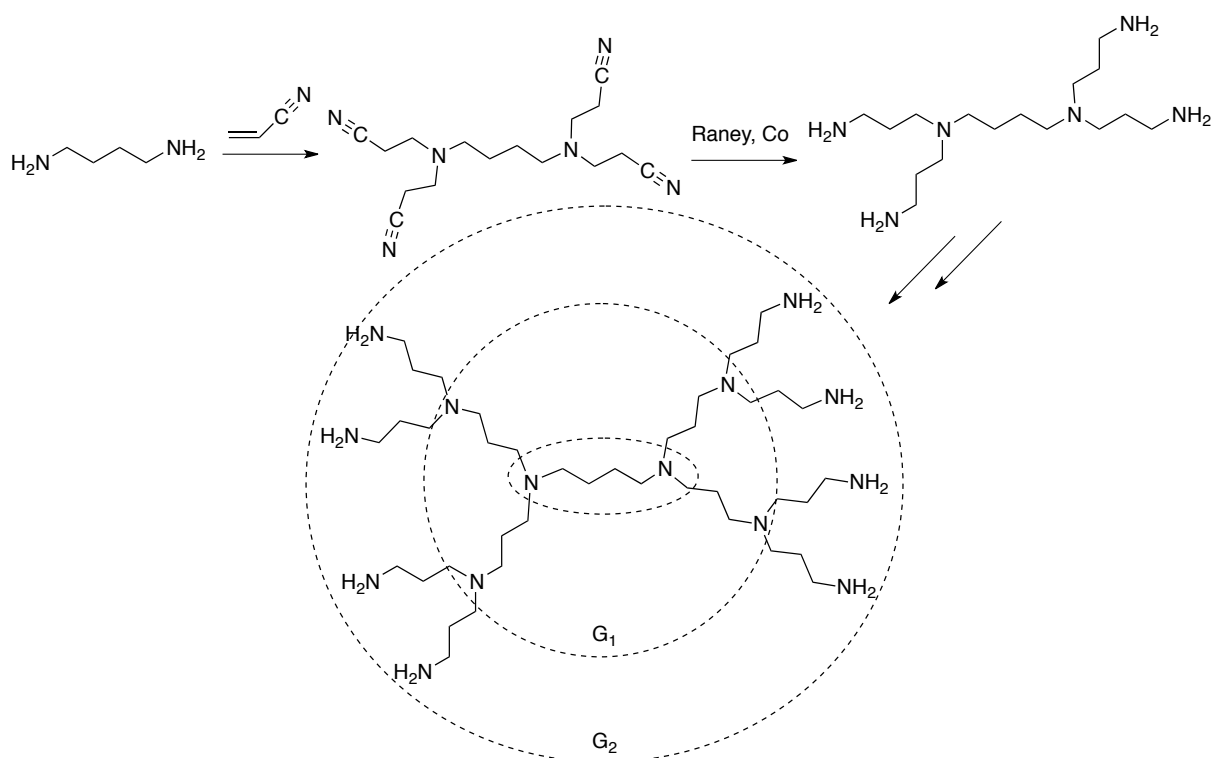


Figure 38 - Synthèse d'un dendrimère PPI de génération G₂.

Gupta et al. ont utilisé cette structure pour l'encapsulation de Sulfasalazin (SSZ), un anti-inflammatoire (cf. Figure 39)¹²⁵. Le PPI de génération 5 a d'abord été synthétisé puis fonctionnalisé avec des L-fucose grâce à un tampon d'acétate de sodium. La molécule d'intérêt a enfin été emprisonnée dans la structure du dendrimère par une longue agitation.

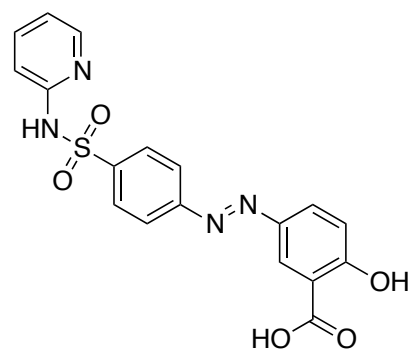


Figure 39 - SSZ.

3. Glycodendrimères basés sur le 2,2-bis(hydroxy-méthyl)propionique acid (bis-MPA)

Les glycodendrimères basés sur l'acide 2,2-bis(hydroxy-méthyl)propionique (bis-MPA) font partie d'un autre type de structure de glycodendrimères en devenir¹²⁶. Ils sont assez faciles à synthétiser ; néanmoins ils sont disponibles commercialement sous le nom de Boltorn® jusqu'à la génération 4 (valence 64).

L'anhydride de l'acide isopropylidène-2,2-bis(méthoxy)propionique permet d'accéder rapidement à l'alcyne et à l'azoture par condensation avec l'alcool approprié (cf. Figure 40). L'enlèvement des groupements protecteurs acétonide par résine acide suivie d'une acylation avec l'anhydride de départ permet la croissance des générations du dendron. Une fois atteinte à la génération voulue, l'anhydride de départ est remplacé, par exemple, par l'anhydride de l'acide pent-4-ynoïque.

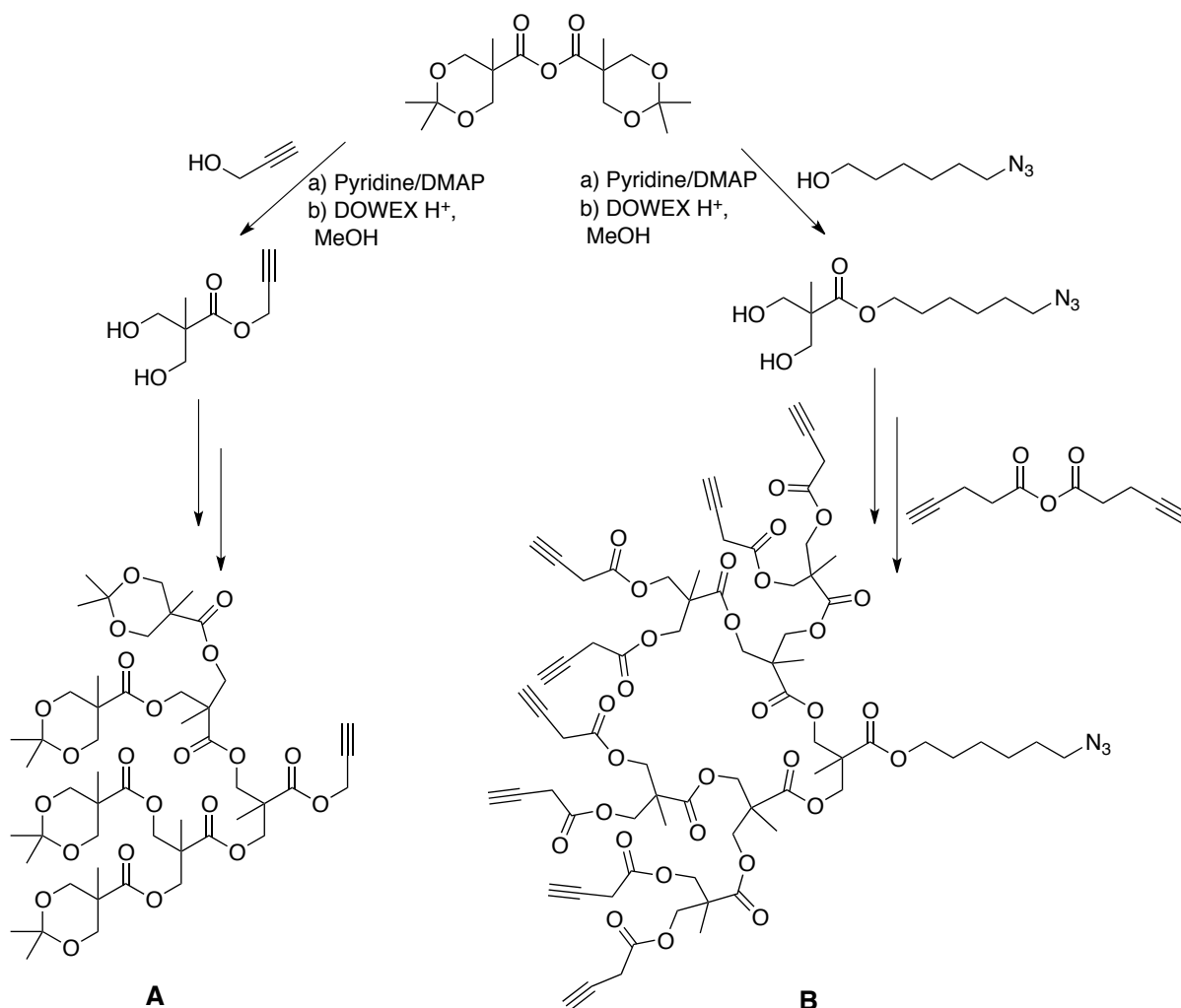


Figure 40 - Synthèse de dendrons à partir du bis-MPA.

D'après cette stratégie le groupe de Hawker a développé toute une librairie de dendrimères. Ils sont partis de deux dendrons distincts basés sur le bis-MPA¹²⁷ :

- un avec le groupement protecteur acétonide en périphérie et un alcyne au point focal (cf. exemple A en Figure 40);
- un autre avec les groupements hydroxyles en périphérie et un azoture au point focal (cf. exemple B en Figure 40).

Ces deux blocs permettent d'avoir une certaine latitude dans le choix de la structure du dendrimère du fait de la stabilité des différentes fonctions et de la sélectivité de la CuAAC. Des dendrons de générations 1 à 4 ont pu être couplés ensemble, mais cette technique a principalement permis la synthèse de glycodendrimères de type Janus, c'est-à-dire le couplage de deux dendrons ayant des fonctionnalités différentes.

Le groupe a ainsi réussi à faire un glycodendrimère reliant un dendron fonctionnalisé par des mannoses et un autre avec des coumarines. En effet, une génération 4 protégée par des acétonides avec au point focal un alcyne est couplé par CuAAC avec une génération 1 libre portant un azoture au point focal. Une première acylation est faite avec l'anhydride de l'acide pent-4-ynoïque, ce qui permet de différencier les deux dendrons et donc de déprotéger les fonctions hydroxyles de celui de génération 4. Deux 7-diéthylaminocoumarine modifiées avec un azoture sont alors ajoutées par CuAAC. Ce qui laisse la place à une nouvelle acylation sur le dendron de génération 4 pour introduire les mannoses périphériques par CuAAC (cf. Figure 41).

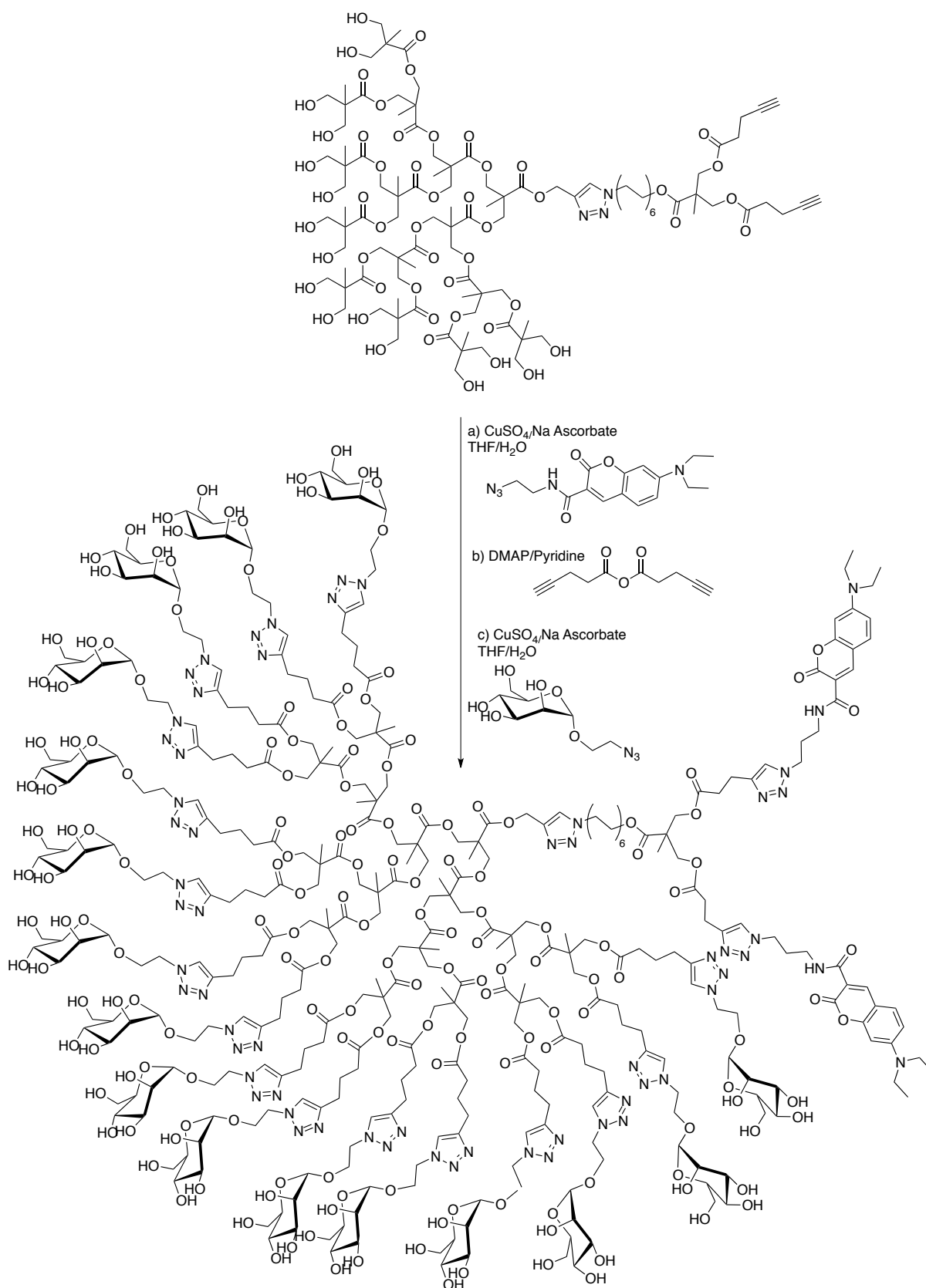


Figure 41 - Exemple d'un glycodendrimère issu du bis-MPA synthétisé par Hawker et al..

IV. Conclusion

Les cellules dendritiques permettent de passer d'une réponse immunitaire non spécifique à une réponse immunitaire spécifique. L'efficacité des cellules dendritiques dans leur rôle de sentinelle est due à la grande diversité des récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires exprimés à leur surface dont notre récepteur cible, DC-SIGN.

Pour augmenter l'interaction faible entre une unité glycosidique et ce récepteur, des ligands multivalents sont nécessaires. Différentes structures existent : glycoclusters, glycopolymères, glyconanoparticules, et enfin les glycodendrimères. Ces derniers ont l'avantage d'être bien définis et de disposer d'une valence plus importante que celle que les glycoclusters pourraient donner, c'est pourquoi cette structure est choisie.

Ces derniers peuvent être divisés en 3 catégories suivant la place de leurs éléments saccharidiques : soit au coeur du dendrimère, soit au coeur et sur l'enveloppe de celui-ci, soit seulement sur son enveloppe. Pour l'interaction étudiée, seulement ces deux derniers sont possibles et vont être essayées.

Chapitre I.

Synthèse des blocs

Une stratégie de synthèse de glycodendrimères pouvant être appliquée à différents monomères et être automatisée a été développée. Elle repose sur la synthèse de trois types de blocs : un bloc Elongateur, un bloc Termineur et une partie saccharidique.

Leurs synthèses ont été développées sur l' α -D-glucopyranoside de méthyle et appliquées avec succès sur d'autres monomères : le pentaérythritol et le D-mannitol.

I. Projet

A. Choix des structures

Ce projet consiste au développement d'une stratégie de synthèse d'un glycodendrimère modèle ayant une forte affinité pour DC-SIGN, pouvant être appliquée à différents monomères.

Les générations ont été reliées par des couplages peptidiques afin d'affectuer la synthèse sur support solide. Plusieurs avantages en découlent, tout d'abord la possibilité d'utiliser un synthétiseur de peptides pour la fabrication à grande échelle de ces glycodendrimères. La modification des branches des glycodendrimères, en ajoutant des acides aminés par exemple, et les purifications sont facilitées. Des structures totalement différentes, ajustables et adaptées à des besoins spécifiques pourront ainsi être synthétisées.

La synthèse requiert la préparation de blocs préparés à l'avance en phase homogène. La synthèse divergente a été choisie pour utiliser au maximum le support solide et ainsi s'affranchir des purifications entre chaque réaction.

Le glycodendrimère se repose sur l'assemblage de quatre parties : un bloc de départ, un bloc Elongateur, un bloc Termineuse et une partie saccharidique. Les blocs proviennent d'un seul et même monomère intermédiaire, comme l'exemple **7a** issu de l' α -D-glucopyranoside de méthyle représenté en Figure 42.

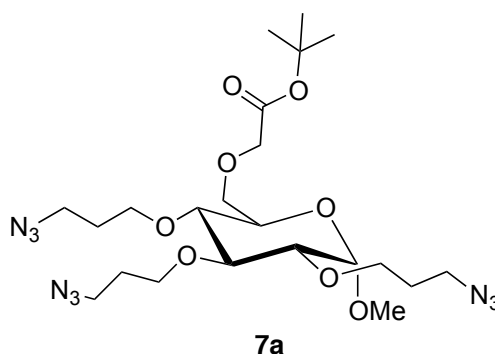


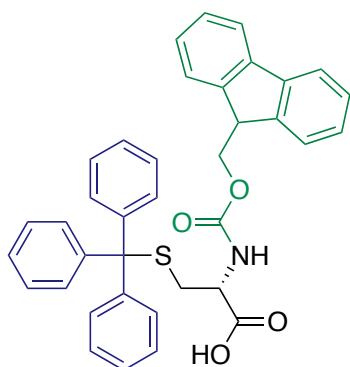
Figure 42 - Exemple d'une molécule charnière, **7a**, basée sur l' α -D-glucopyranoside de méthyle.

Pour éviter un grand nombre d'étapes, une expansion importante du dendrimère a été voulue, de ce fait, des monomères hyperbranchés ont été choisis, avec au moins quatre branches : trois similairement modifiées et une autre avec un acide carboxylique protégé.

1. Bloc de départ

Le bloc de départ, en rouge sur la Figure 44, est composé d'un acide aminé, une cystéine, et d'un bloc comportant un acide carboxylique et des amines protégés c'est-à-dire le bloc Elongateur. Il est préparé directement sur le support solide grâce au placement du premier acide aminé sur la résine puis du couplage avec le bloc Elongateur.

Ce bloc formera le coeur du glycodendrimère d'où son nom de bloc de départ.



L'acide aminé permet à la fois d'espacer le support solide de la structure multivalente, mais aussi d'offrir une nouvelle fonction disponible pour une future fonctionnalisation supplémentaire du glycodendrimère, telle qu'un marquage fluorescent, donnant accès à un glycodendrimères de type Janus.

Figure 43 - Fmoc-Cys(Trt)-OH.

Le choix s'est porté sur une cystéine du fait que son thiol protégé permettra d'accéder à une chimie différente de l'acide carboxylique.

2. Bloc Elongateur

Le bloc Elongateur, en bleu sur la Figure 44, est composé d'amines protégées par des groupements Fmoc et d'un acide carboxylique protégé orthogonalement par un tert-butyle. Cette stratégie Fmoc permet, lors de la synthèse sur support solide, de s'affranchir du clivage à l'acide fluorhydrique associé à la stratégie Boc, lequel est incompatible avec les glycodendrimères voulus. En effet, l' α -D-glucopyranoside de méthyle, servant de monomère à certains glycodendrimères envisagés, mais aussi les fucosides mis par CuAAC sur support solide, ne tiendront pas à ce traitement.

En déprotégeant les amines du dendrimère de génération i , elles vont pouvoir réagir avec l'acide carboxylique d'un autre bloc Elongateur ou bien d'un bloc Termineuseur suivant la génération voulue, donnant le dendrimère de génération $(i+1)$.

3. Bloc Termineuseur

Le bloc Termineuseur, en marron sur la Figure 44, est composé d'azotures et d'un acide carboxylique protégé par un tert-butyle. Il tire son nom du fait que c'est le dernier bloc mis pour finir l'augmentation de génération, il donne ainsi la valence du dendrimère.

Ces azotures permettent d'accrocher la partie saccharidique sur le dendrimère via une CuAAC. Cette dernière est une réaction efficace, qui, au vu du nombre de réactions simultanées à faire, permettra d'avoir des rendements convenables.

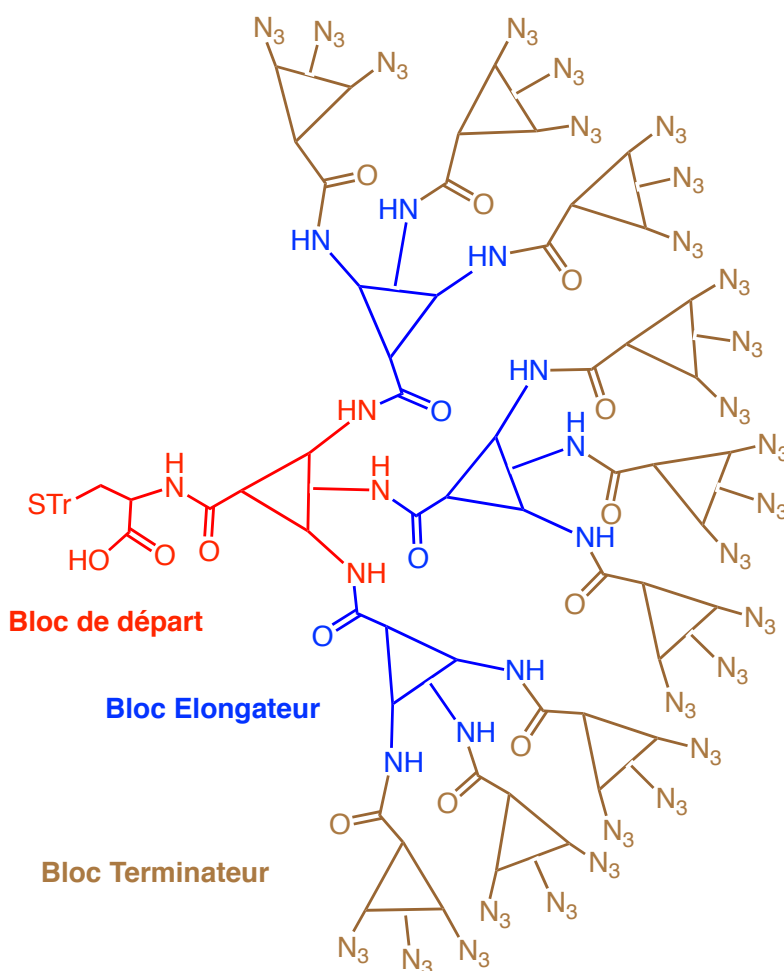


Figure 44 - Modèle de dendrimère synthétisé avec 3 parties : le bloc de départ en rouge, le bloc Elongateur en bleu et le bloc Termineuseur en marron.

B. Différents blocs de synthèse choisis

L'interaction avec la cible choisie dépend de la structure du dendrimère, de ses groupements de surface, de la méthodologie utilisée, ...^{128, 129}. Il n'est pas rare de trouver que la valence la plus élevée ne donne pas l'IC₅₀ la plus importante, dans certains cas, une valence de 4 sera meilleure que 16 et dans d'autres cas, ce sera le contraire¹³⁰. Cet effet peut être dû, par exemple, au rassemblement important des éléments glycosylés, trop immobilisés pour interagir efficacement.

Il est ainsi nécessaire de diversifier les structures à analyser et de juger de la nécessité d'augmenter en génération en regardant la difficulté à obtenir les blocs bien définis et l'IC₅₀ final.

Le monomère doit être plutôt hydrophile et de compacité variable pour pouvoir aérer plus ou moins le coeur du dendrimère. De ce fait, les monomères choisis sont l' α -D-glucopyranoside de méthyle, le pentaérythritol et le D-mannitol.

Ces trois monomères sont peu onéreux (250euros/kg pour le l' α -D-glucopyranoside de méthyle¹³¹, 35euros/kg pour le pentaérythritol¹³² et 105euros/kg pour le D-mannitol¹³³). Ils possèdent chacun des spécificités l'un par rapport aux autres.

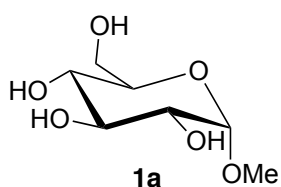


Figure 45 - L' α -D-glucopyranoside de méthyle.

L' α -D-glucopyranoside de méthyle (cf. Figure 45) permettra d'avoir un dendrimère final peut-être plus soluble que les autres structures prévues.

Il possède un alcool primaire qui permet d'effectuer une première étape de différenciation de branche sélective.

Les problèmes d'anomérisation et de stéréochimie sont écartés par la protection de celui-ci par un méthyle.

Le pentaérythritol (cf. Figure 46) a une structure plus compacte. Sa symétrie permettra une caractérisation via RMN plus facile que les autres structures prévues, ce qui pourra aider lors de la caractérisation du dendrimère.

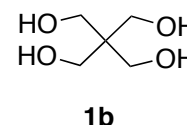
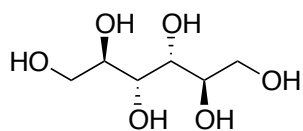


Figure 46 - Pentaérythritol.

Le D-mannitol (cf. Figure 47) a deux alcools primaires, ils peuvent être soit protégés tous les deux, soit un seul. Ce qui amène à un monomère ayant respectivement une et deux branches supplémentaires.



1c

Figure 47 - D-mannitol.

II. Synthèse des blocs, exemple sur ceux basés sur l' α -D-glucopyranoside de méthyle

Pour les trois blocs choisis, la stratégie de synthèse est la même, elle passe par les mêmes réactions avec des adaptations des conditions de réaction. Les molécules sont donc différenciées par un numéro explicitant la réaction et une lettre explicitant sa structure, respectivement a, b, c, d pour l' α -D-glucopyranoside de méthyle, le pentaérythritol, le D-mannitol à 5 branches similaires et le D-mannitol à 4 branches similaires.

La stratégie de synthèse est donnée sur l'exemple de l' α -D-glucopyranoside de méthyle, les différenciations et les schémas de synthèse des autres structures seront explicités par la suite.

Les réactions ont été faites sur petite échelle avant d'être validées sur grande échelle (50 grammes de réactif de départ). Des problèmes de changement d'échelle sont survenus principalement lors des purifications.

A. Tritylation

Comme précisé dans la partie précédente, une des quatre branches du monomère constituant doit être différenciée ; pour cela un groupement protecteur, le triphénylméthyle, est mis sur un des alcools. Son importante taille lui confère une grande régiosélectivité envers les alcools primaires, il est ainsi particulièrement adapté pour notre cas¹³⁴.

Cette protection a ainsi été utilisée pour former **2a** (cf. Figure 48) suivant le protocole développé par Monrad et al. utilisant du chlorure de trityle dans de la pyridine¹³⁵. Le choix de ce dernier a été motivé par ses propriétés basiques qui permettent de piéger les protons et ainsi de déplacer la réaction S_N1 dans le sens voulu.

La purification est faite par cristallisation à chaud dans du toluène avec un bon rendement (78%).

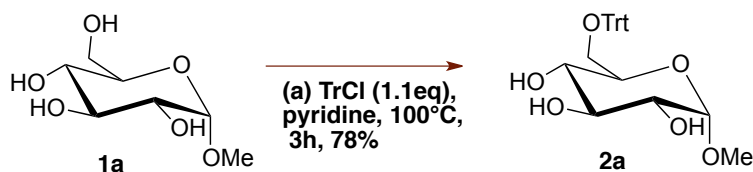


Figure 48 - Tritylation de l' α -D-glucopyranoside de méthyle.

B. Synthèse des bras espaceurs : Per-Allylation et Per-Hydroboration

L'allongement des branches du monosaccharide est nécessaire pour éviter toute gêne stérique lors de l'augmentation en génération du dendrimère. Plusieurs voies de synthèse ont été essayées par les pionniers des sucres pieuvres 'octopus', Lindhorst et al., sur les 5 branches d'un mannose¹⁰⁶.

La voie la plus rapide est de procéder à la fois à l'allongement des branches du monosaccharide et à l'introduction des amines. Pour cela, une première technique essayée par Lindhorst et al. a été de faire une substitution nucléophile avec un espaceur halogéné contenant une amine, tel que le 3-bromopropan-1-amine (cf. voie B sur la Figure 49). Cependant le produit attendu n'a pas été obtenu, montrant une réactivité plus complexe lors de réactions sur des sites multiples comme nos composés. L'utilisation d'acrylonitrile et la réduction de la fonction induite a alors été essayée (cf. voie A sur la Figure 49). Toutefois, cette méthode a conduit à la formation de sous-produits qui n'ont pu être séparés du produit attendu.

Lindhorst et al. ont alors essayé de seulement allonger les branches du monosaccharide. La première idée a été de per-allyler et d'ozonolyser toutes les fonctions disponibles pour avoir le dérivé hydroperoxyde. Celui-ci a été ensuite réduit grâce à du NaBH_4 en son homologue alcool (cf. voie C Figure 49). Néanmoins, le rendement global est assez faible, 34%, et l'espacement de deux carbones obtenu

pourrait gêner l'augmentation en génération du dendrimère, cette voie n'a donc pas été suivie.

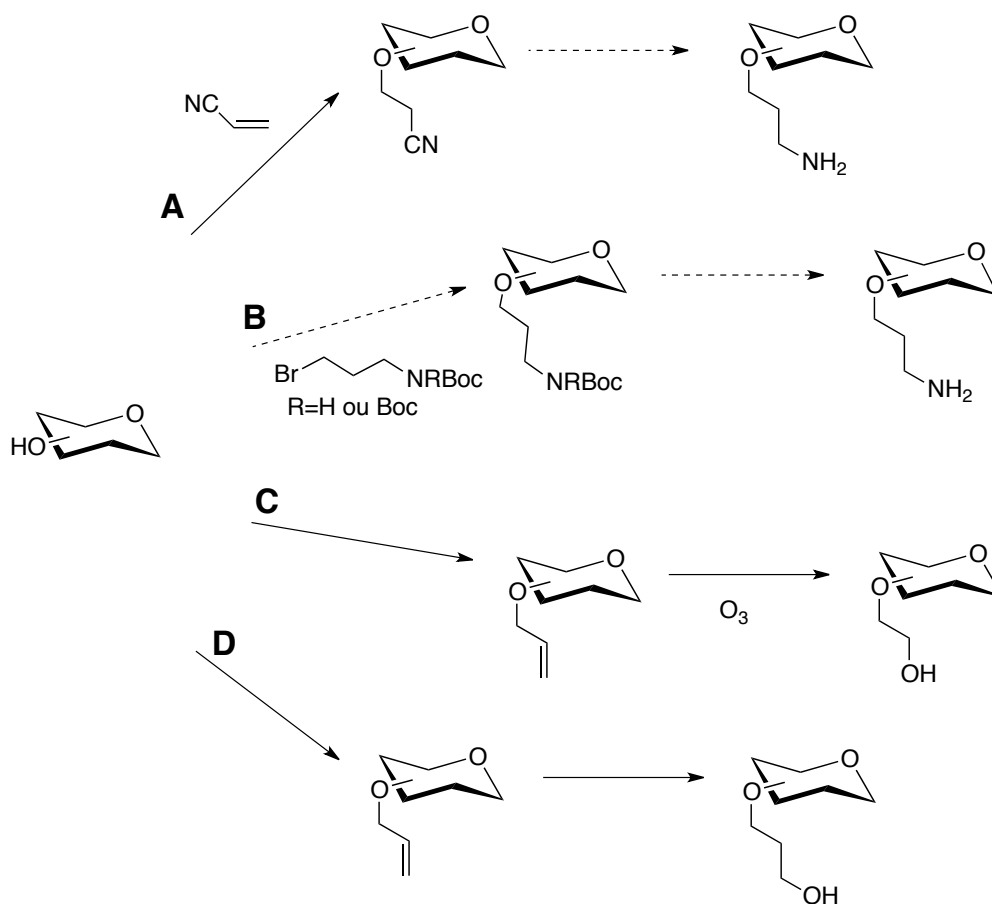


Figure 49 - Différentes possibilités d'allongement des branches d'un monosaccharide essayées par Lindhorst et al..

Il s'est révélé que le passage par une per-allylation et une per-hydroboration est la voie la plus exploitable (cf. voie D Figure 49). En effet, elle donne un espacement suffisant de trois carbones et permet d'obtenir des rendements prometteurs avec par exemple un de 58% pour la per-allylation et la per-hydroboration d'un disaccharide (8 fonctions). Cette voie a donc été choisie pour espacer nos blocs.

1. Per-allylation

La per-allylation du tri-ol avec le bromure d'allyle et de l'hydrure de sodium dans du DMF donne le composé **3a** (cf. Figure 50) avec un bon rendement (85%)¹³⁶. Les alcools n'étant pas assez réactifs pour la substitution nucléophile, il a été nécessaire de

les déprotonner avec une base forte comme le NaH. Une précaution particulière à l'ajout de ce dernier doit être faite du fait de la réaction exothermique produite et des quantités souvent importantes à ajouter.

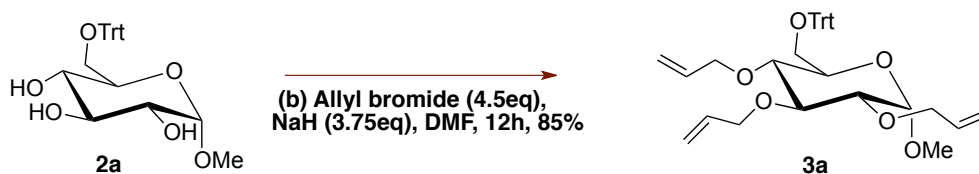


Figure 50 - Per-allylation de 2a.

Une grande quantité d'huile minérale se retrouve dans le brut réactionnel pour des raisons de sécurité, représentant 40% de la masse de NaH mise. Malheureusement le produit est très apolaire ce qui complique la purification sur silice. Celle-ci n'est néanmoins pas obligatoire, mais fortement recommandé à la vue du prix du réactif boré utilisé dans la réaction suivante (313euros les 800mL sur sigma-aldrich¹³⁷), et du nombre d'équivalent à mettre (2eq/fonction).

2. Per-hydroboration

L'hydroboration, représentée sur la Figure 53, a été effectuée en deux étapes pour donner le composé **4a** avec un rendement de 72%¹³⁸.

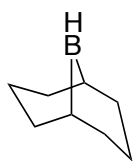


Figure 51 -
9-BBN.

Une première addition du borane sur l'alcène est faite, celle-ci peut donner deux produits, soit l'alcool primaire soit l'alcool secondaire. Le passage par un carbocation et l'effet anti-Markovnikov permet d'avoir la régiosélectivité voulue dans un rapport de 96 pour 4 avec du BH₃. Pour accentuer cet effet, un borane encombré, du 9-Borabicyclo(3.3.1)nonane (9-BBN) (cf. Figure 51), a été utilisé. Dhillon et al. ont remarqué une diminution de l'apparition de sous-produit pouvant aller, dans certains cas, à moins de 0.01%¹³⁹.

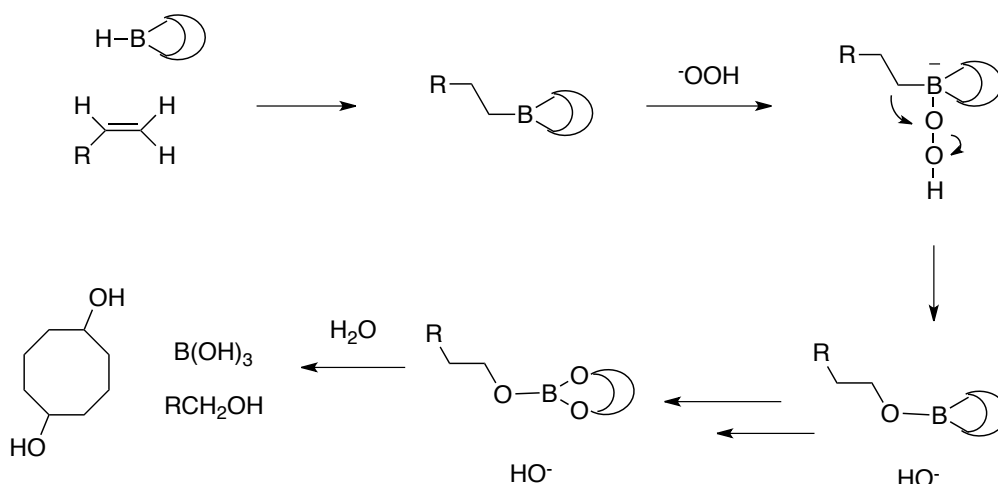
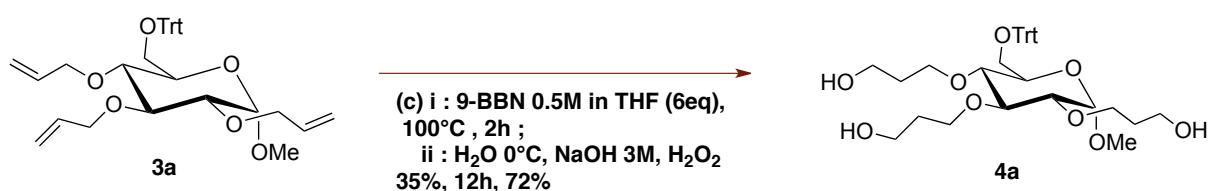


Figure 52 - Mécanisme d'hydroboration avec du 9-BBN sur un alcène terminal.

S'ensuivent l'hydrolyse du 9-BBN en excès et l'oxydation du produit boré grâce à l'ajout délicat de soude à 3M puis de peroxyde d'hydrogène (l' H_2O_2) à 35%. Un anion dérivé du mélange de ces derniers (^-OOH) attaque l'atome de Bore, un de ses groupements alkyle migre alors vers l'atome d'oxygène. Les attaques se répètent jusqu'à qu'il n'y ait plus de groupements alkyle. L'hydrolyse libère enfin les alcools finaux (cf. Figure 52). Une attention particulière a été demandée pour le traitement de cette réaction au vu de l'excès de H_2O_2 et des quantités engagées.

Figure 53 - Per-hydroboration de l' α -D-glucopyranoside de méthyle.



C. Azidation

Dans un premier temps, le passage par un mésylate grâce à du chlorure de mésyle a été fait. Cette substitution nucléophile entraîne une production de HCl qu'il faut neutraliser afin de déplacer la réaction vers la formation du produit. Pour cela, la pyridine a été choisie pour jouer à la fois le rôle de solvant et de base. Une fois le réactif

disparu, l'azidation est lancée : de l'azoture de sodium dans du DMF, catalysé par de l'iodure de sodium donne **5a** (cf. Figure 54)¹⁴⁰.

Au vu du faible rendement obtenu, des modifications au niveau des quantités de chlorure de mésyle et de l'azoture de sodium ont été réalisées, respectivement de 3.6eq à 5eq et de 3.6eq à 6eq, sans grand succès, au mieux 32% de rendement a été obtenu. L'utilisation d'un groupement Tosyle a alors été testée en se reposant sur une publication de Arslanastas et al.¹⁴¹. Le produit devait cristalliser dans du méthanol chaud, au lieu de cela il était sous forme d'une pâte assez difficile à solubiliser, ce qui a arrêté l'essai.

Un bref essai de iodation a été fait avec de la triphénylphosphine et de l'iode dans du DMF, avec seulement 36% de rendement, faisant écourter l'essai.

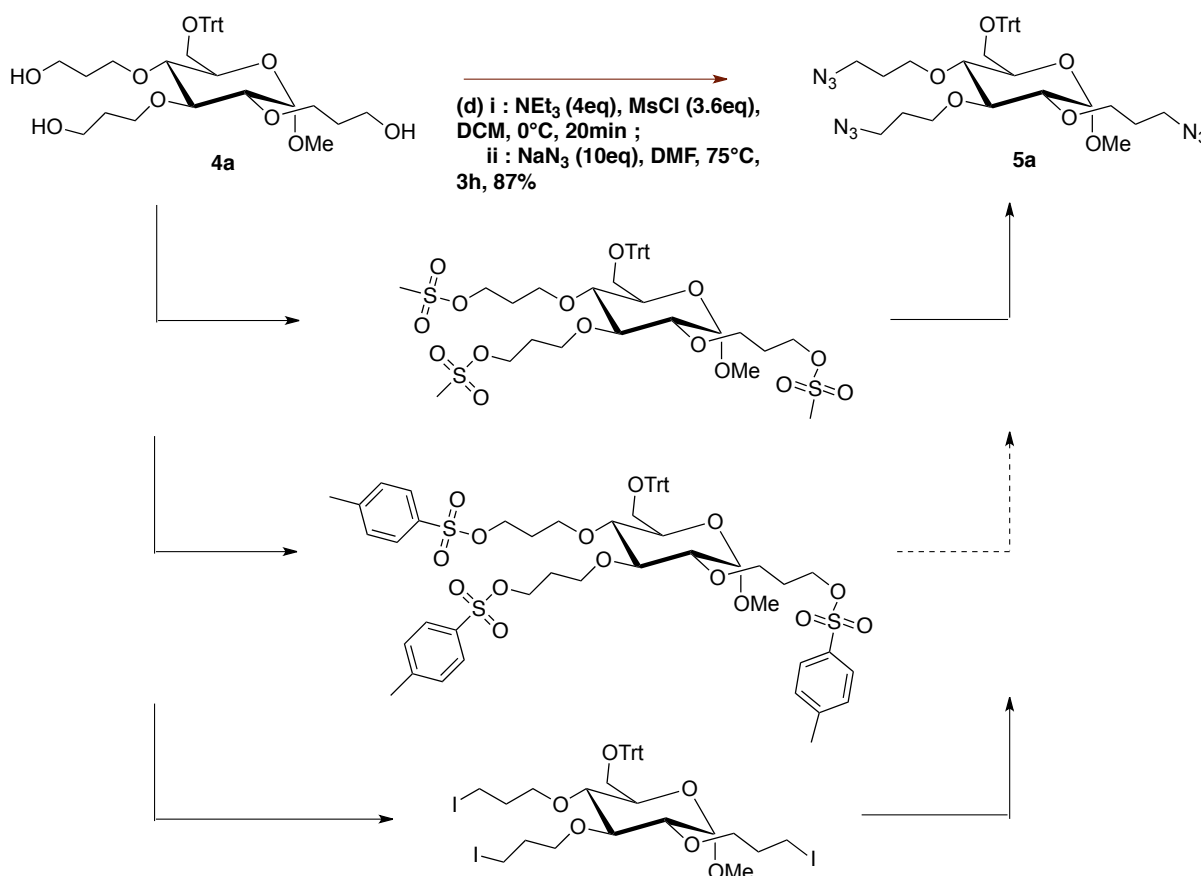


Figure 54 - Essais d'azidation de 4a.

Pour mieux appréhender le problème, les produits de l'azidation ont été isolés et analysés par RMN. Ceux-ci ont montré la présence d'un déplacement de type $-\text{CH}_2\text{-Cl}$, ce qui peut s'expliquer par la substitution des produits mésylés par les ions chlorure issus du chlorhydrate de pyridinium. En effet, vu les quantités employées, la neutralisation de la pyridine avec des traitements d'HCl est délicate, une évaporation avait ainsi été faite. La température d'ébullition étant élevée, la température du bain avait du être montée à 60°C ce qui favorisa probablement cette réaction secondaire.

Un retour vers une mésylation a donc été effectué en remplaçant la pyridine par un mélange de dichlorométhane et de triéthylamine. La réaction a été faite cette fois-ci rapidement et à froid. Un changement de solvant est néanmoins nécessaire pour l'azidation étant donné que le dichlorométhane et l'azoture de sodium de la réaction suivante forment du diazotométhane, substance explosive. Un reste de solvant peut engendrer des explosions lors de l'évaporation, une attention particulière a donc été donnée à cette étape^{142, 143}.

Des quantités plus importantes d'azoture de sodium ont été utilisées (10eq) pour s'assurer de la bonne marche de la réaction. Quelques gouttes d'eau ont été ajoutées au DMF pour faciliter la dissolution du NaN_3 . Le rendement global de ces deux réactions atteint 87%.

Dans l'optique d'optimisation, ces deux réactions ont été essayées "one-pot" en changeant le solvant de la mésylation par du DMF avec les mêmes conditions de réaction (cf. Figure 55)¹⁴⁴. Une petite baisse de rendement a été observée en obtenant 79%, néanmoins cette méthode sera préférée du fait du gain de temps du traitement.

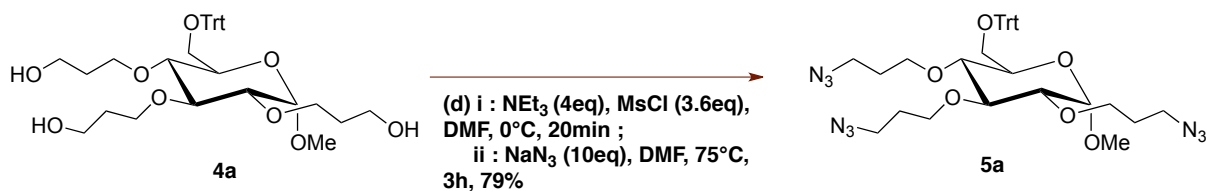


Figure 55 - Per-mésylation et per-azidation de 4a.

Par ailleurs, l'essai de suppression de la purification sur silice après l'hydroboration tout en laissant le traitement s'est trouvé concluant avec un bon rendement global de 71% sur l'hydroboration, la méthylation et l'azidation.

D. Changement de protection de l'alcool primaire

Pour accéder à la fonction acide carboxylique nécessaire à la construction du dendrimère, une déprotection de l'alcool primaire de **5a** puis son alkylation avec une molécule possédant la fonction recherchée protégée ont été faites. Le choix s'est porté sur le tert-butyl 2-bromoacétate.

L'oxydation de la position 6 aurait aussi été possible pour introduire l'acide carboxylique, mais nous aurions eu un proton énolisable ou éliminable en alpha du carbonyle, potentiellement gênant par la suite.

Les azotures étant stables en milieu acide, la déprotection de l'alcool a été faite avec de l'acide paratoluènesulfonique (APTS) en quantité catalytique dans un mélange de DCM/MeOH, le méthanol piégeant les cations générés, pour avoir le composé **6a** avec un rendement satisfaisant de 80% (cf. Figure 56).

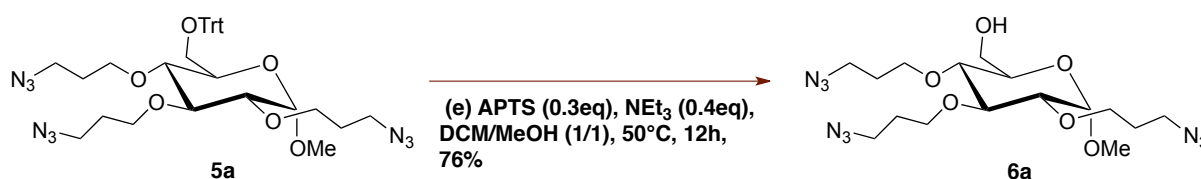


Figure 56 - Détritylation de l'alcool primaire de **5a**.

Dans un premier temps, le tert-butyl 2-bromoacétate a été introduit par une réaction de Williamson, du NaH mis en excès dans du DMF a alors été utilisé pour déprotonner l'alcool primaire. Lors de la neutralisation de l'excès de base par du méthanol, un méthanolate a été formé (MeO⁻Na⁺) provoquant la trans-estérification du composé **7a** en ester de méthyle. Les esters tert-butyliques étant plus volumineux et difficilement attaquables par des nucléophiles, la quantité de sous-produit devait être faible; malheureusement, il était dans des proportions non négligeables (30%). De plus,

la quantité importante d'huile minérale due au NaH (40% de la masse de NaH) gênait la réaction. Le rendement obtenu à ce stade était assez moyen (48%).

Entre temps, une autre stratégie plus performante a été développée. La réaction a été effectuée dans un milieu biphasique comprenant du toluène, de la soude très concentrée et un catalyseur de transfert de phase, le bromure de tetra-*n*-butylammonium (TBAB) (cf. Figure 57). La base, l'hydroxyde de tetrabutyl ammonium, passe dans le toluène et déprotonne l'alcool afin qu'il puisse être substitué par le tert-butyl 2-bromoacétate pour donner **7a** avec un rendement de 85% (cf. Figure 58).

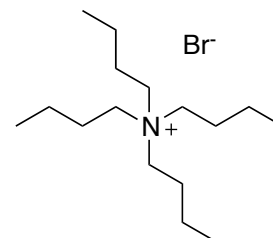


Figure 57 - TBAB.

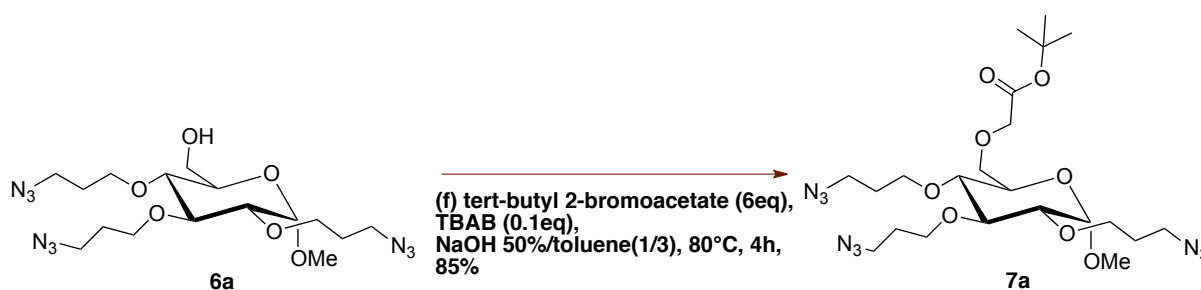


Figure 58 - Tert-butylation de 6a.

7a est une molécule charnière pour la construction des glycodendrimères, elle a été obtenue avec un rendement global satisfaisant de 30% pour 7 étapes. Elle peut soit constituer le bloc Termineuse en faisant une déprotection de l'acide carboxylique, soit constituer le bloc Elongateur en procédant à la réduction des azotures en amines, à la protection de ces dernières avec des groupements Fmoc et enfin à la déprotection de l'acide carboxylique.

E. Préparation du bloc Termineuse

La déprotection de l'acide carboxylique se fait grâce à du TFA dilué dans du DCM dans une proportion 1/1. La réaction est assez rapide, au bout de 40 minutes seulement l'acide carboxylique est libéré, **8a** est obtenu avec un rendement de 99% (cf. Figure 59).

Le contrôle par RMN du proton du produit ne montre pas d'anomérisation, la conformation est restée α .

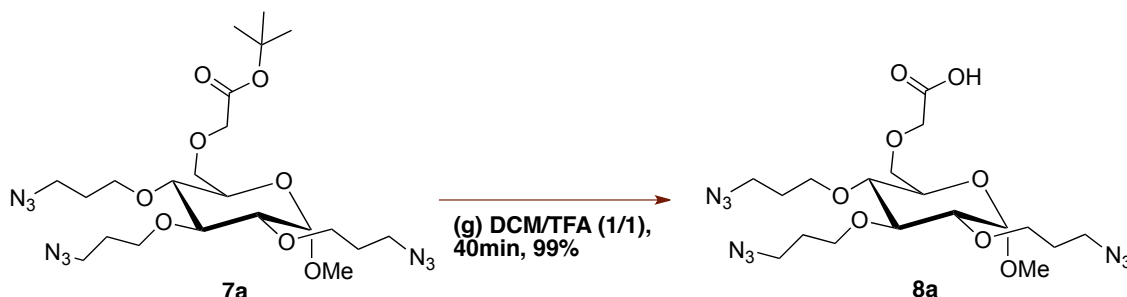


Figure 59 - Déprotection de l'acide carboxylique de 7a pour l'obtention du bloc Terminateur issu de l' α -D-glucopyranoside de méthyle.

F. Préparation du bloc Elongateur

Pour préparer le bloc Elongateur à partir de la molécule charnière **7a**, trois réactions distinctes ont été nécessaires.

1. Réduction des azotures en amines

La première étape est la réduction des azotures en amines (cf. Figure 61). Pour des raisons de commodité, la réduction par hydrogène n'a pas été utilisée. En effet, la synthèse se fait au niveau de la dizaine de grammes, le laboratoire n'est pas équipé pour effectuer cette réaction sur de telles quantités. La méthode par Staudinger a été donc privilégiée. Elle a été faite en deux étapes, l'addition de triphénylphosphine (PPh_3) sur l'azoture qui après réarrangement formera de l'iminophosphorane qui a été ensuite hydrolysé pour former l'amine voulue (cf. réaction type en Figure 60).

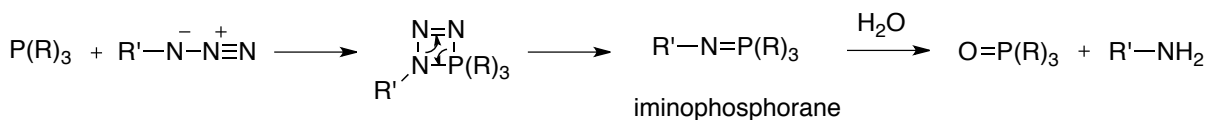


Figure 60 - Réaction de Staudinger.

Le principal inconvénient de cette méthode est la formation d'oxyde de phosphine, assez difficile à éliminer surtout à la vue des quantités mises en jeu.

2. Protection des amines

S'ensuit la protection des amines par des groupements Fmoc. Cette dernière s'effectue dans un mélange eau/THF compatible avec la réaction précédente. Aucune interaction n'intervient entre les deux réactions, ainsi elles sont faites "one-pot". Pour cela, du *N*-(9-Fluorenylmethoxycarbonyloxy) succinimide (FmocOSu) a été ajouté avec de la triéthylamine aux amines précédemment synthétisées pour former **9a** (cf. Figure 61).

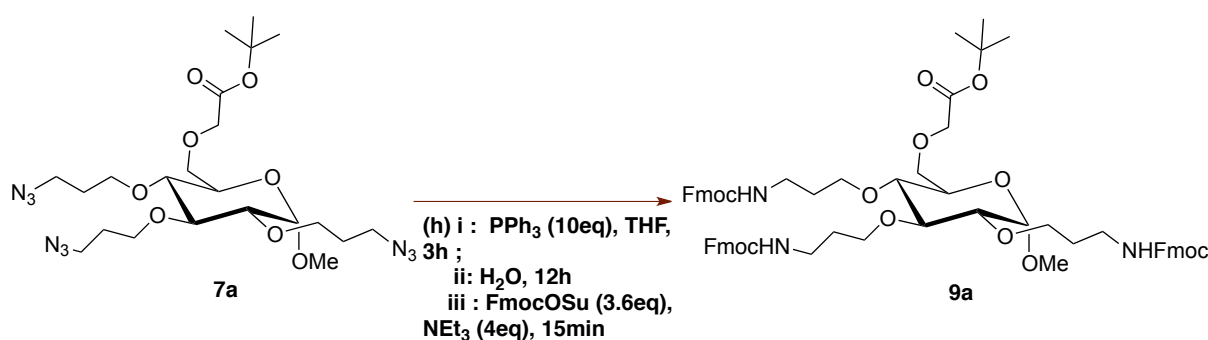


Figure 61 - Réduction des azotures et protection des amines de **7a**.

Des problèmes sont survenus lors de la purification. Les multiples sous-produits sont difficilement séparables. A cela s'additionne le problème des quantités importantes d'oxyde de phosphine obtenues et de triphénylphosphine restantes qui gêne la purification. Néanmoins, après de multiples essais, une petite partie a été purifiée avec un mélange toluène/acétate d'éthyle/DCM (10/60/30) pour caractérisation. Par ailleurs, l'association de l'oxyde de phosphine avec les restes de Fmoc fait prendre en masse le brut réactionnel assez rapidement le rendant difficilement soluble et ainsi multipliant les colonnes de purification. Vu l'efficacité du mélange de purification par rapport au temps mis et à la quantité obtenue, une purification plus sommaire a été faite grâce à du cyclohexane/acétate d'éthyle (5/5) en attendant la précipitation à l'éther froid de l'étape suivante qui enlèvera l'oxyde de phosphine restant.

3. Déprotection de l'acide carboxylique

Pour finir, la déprotection de l'acide carboxylique a été effectuée (cf. Figure 62). Comme pour le bloc Termineur, du TFA dilué dans du DCM a été utilisé dans une proportion 1/1 pendant 20min. Le produit **10a** précipite dans de l'éther froid en de très fines particules avec un rendement de 83%.

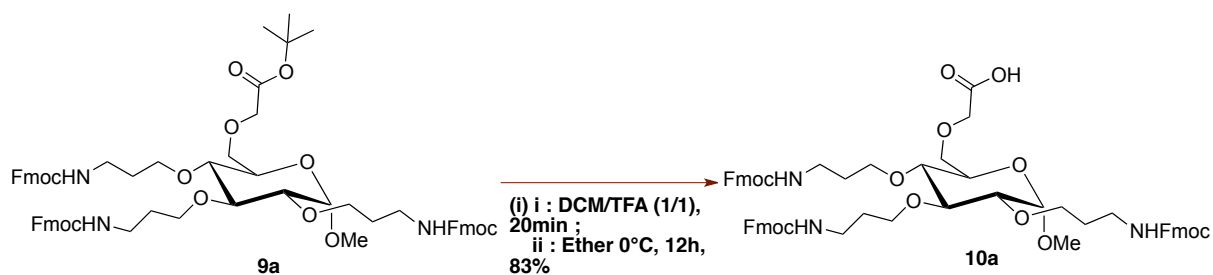


Figure 62 - Déprotection de l'acide carboxylique de **9a** pour l'obtention du bloc Elongateur **10a** issus de l' α -D-glucopyranoside de méthyle.

Une stratégie de synthèse a ainsi été développée pour l' α -D-glucopyranoside de méthyle, avec la formation d'une molécule charnière **7a** avec un rendement global satisfaisant de 30% pour 7 étapes. Celle-ci a donné la formation à un bloc Terminateur **8a**, avec un rendement global de 30% et à un bloc Elongateur **10a**, avec un rendement global de 17% (rendement de 55% sur les 3 étapes de **7a** à **10a**).

III. Expansion de la synthèse : Pentaérythritol et D-mannitol

La stratégie de synthèse explicitée sur l'exemple de l' α -D-glucopyranoside de méthyle a ainsi été testée sur les autres structures. Les différences ainsi que les schémas récapitulatif de synthèse seront exposés.

A. Synthèse des blocs basés sur le pentaérythritol

Pour le pentaérythritol, les problèmes surviennent dès la première étape (cf. Figure 63). En effet, la molécule étant symétrique, les quatre alcools sont identiques et ne permettent pas une préférence d'attaque du trityle contrairement à l' α -D-glucopyranoside de méthyle. Ainsi, pour limiter la formation de sous-produits ditritylés, le nombre d'équivalent du chlorure de trityle a été limité à 1, un rendement faible a ainsi été obtenu. Ceci étant, ce n'est pas un problème rédhibitoire car la molécule de départ est très bon marché et la réaction est en début de synthèse.

Comme précédemment, la purification de la per-hydroboration n'est pas nécessaire et la méssylation-azidation se fait "one-pot" avec un bon rendement de 55% (cf. Figure 64). La détritulation de **5b** en **6b** se fait sans problème avec un bon rendement de 84% (cf. Figure 65).

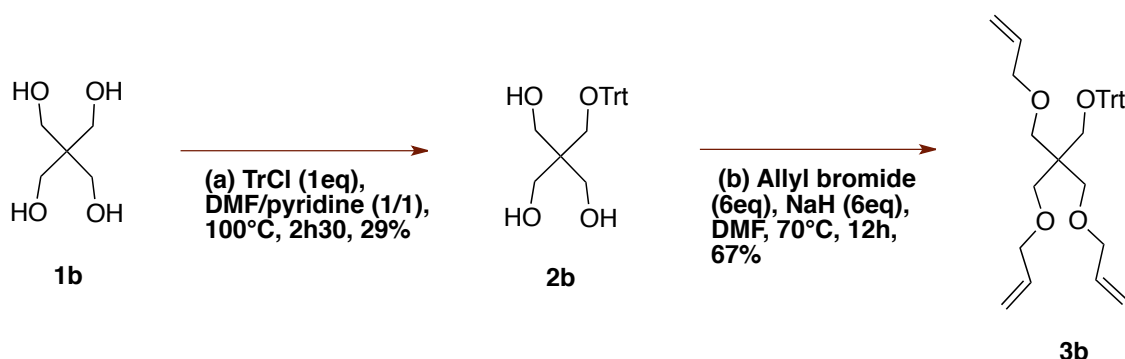


Figure 63 - Tritylation et per-allylation du pentaérythritol.

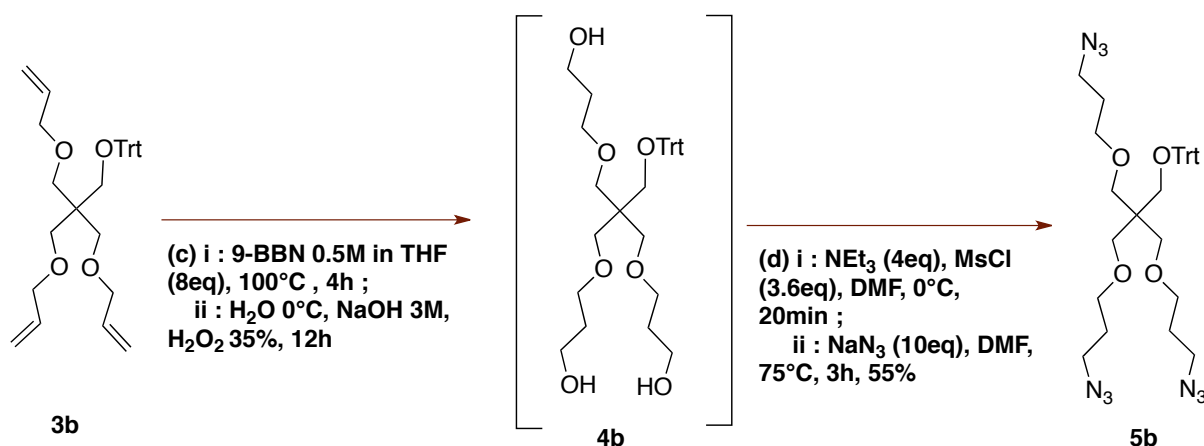


Figure 64 - Per-hydroboration, per-mésylation et per-azidation de **3b**.

Des problèmes sont ensuite survenus lors de l'alkylation de **6b**. Les conditions du bloc exemple (tertbutyl 2-bromoacétate, TBAB, NaOH/Toluène (1/3), 80°C pendant 4h) n'ont pas donné le produit voulu pour le pentaérythritol. En effet, le chauffage a entraîné la détertbutylation de l'acide carboxylique, **8b**, et une présence significative de réactif de départ, **6b**. Le rendement n'était pas assez intéressant pour poursuivre cette voie afin d'obtenir directement **8b**.

Ainsi le chauffage a été remplacé par un plus long temps de réaction, arrivant à un rendement comparable à l'exemple, c'est-à-dire 87% de **7b** (cf. Figure 65).

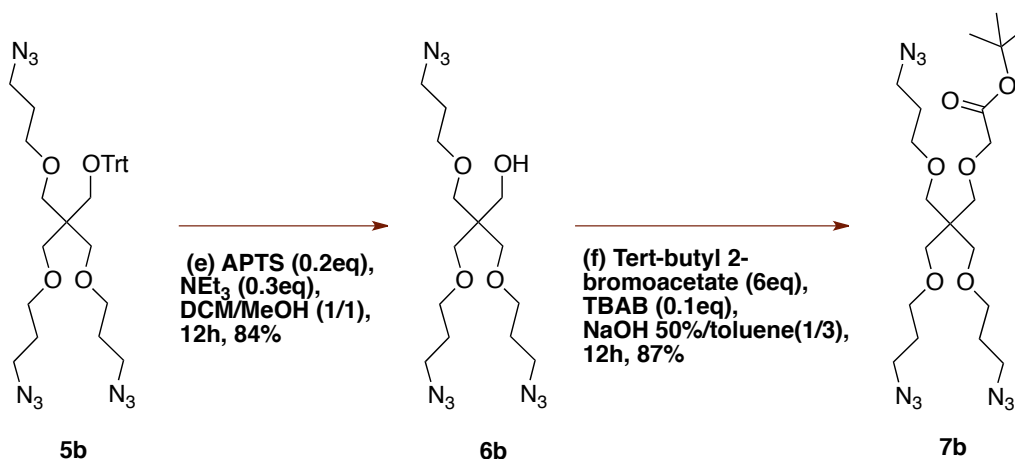


Figure 65 - Détritylation et alkylation de **5b**.

Pour la formation du bloc Termineur **8b**, les conditions du bloc modèle ont été reprises : du TFA dilué dans du DCM avec une proportion 1/1 pendant 20 minutes. Cependant, le rendement obtenu était très décevant, seulement 17%. Différentes

dilutions de TFA dans du DCM ont été entreprises pour arriver au mélange TFA/DCM à 2/8 pendant 5h pour un rendement de 61% (cf. Figure 66).

La formation du bloc Elongateur **10b** (cf. Figure 66) s'est confrontée aux mêmes problèmes que pour le bloc modèle : des sous-produits difficilement séparables et une prise en masse rendant la purification très complexe. Une purification sommaire a été faite grâce à du cyclohexane/acétate d'éthyle (5/5) en attendant la précipitation à l'éther froid de l'étape suivante qui enlèvera l'oxyde de phosphine restant.

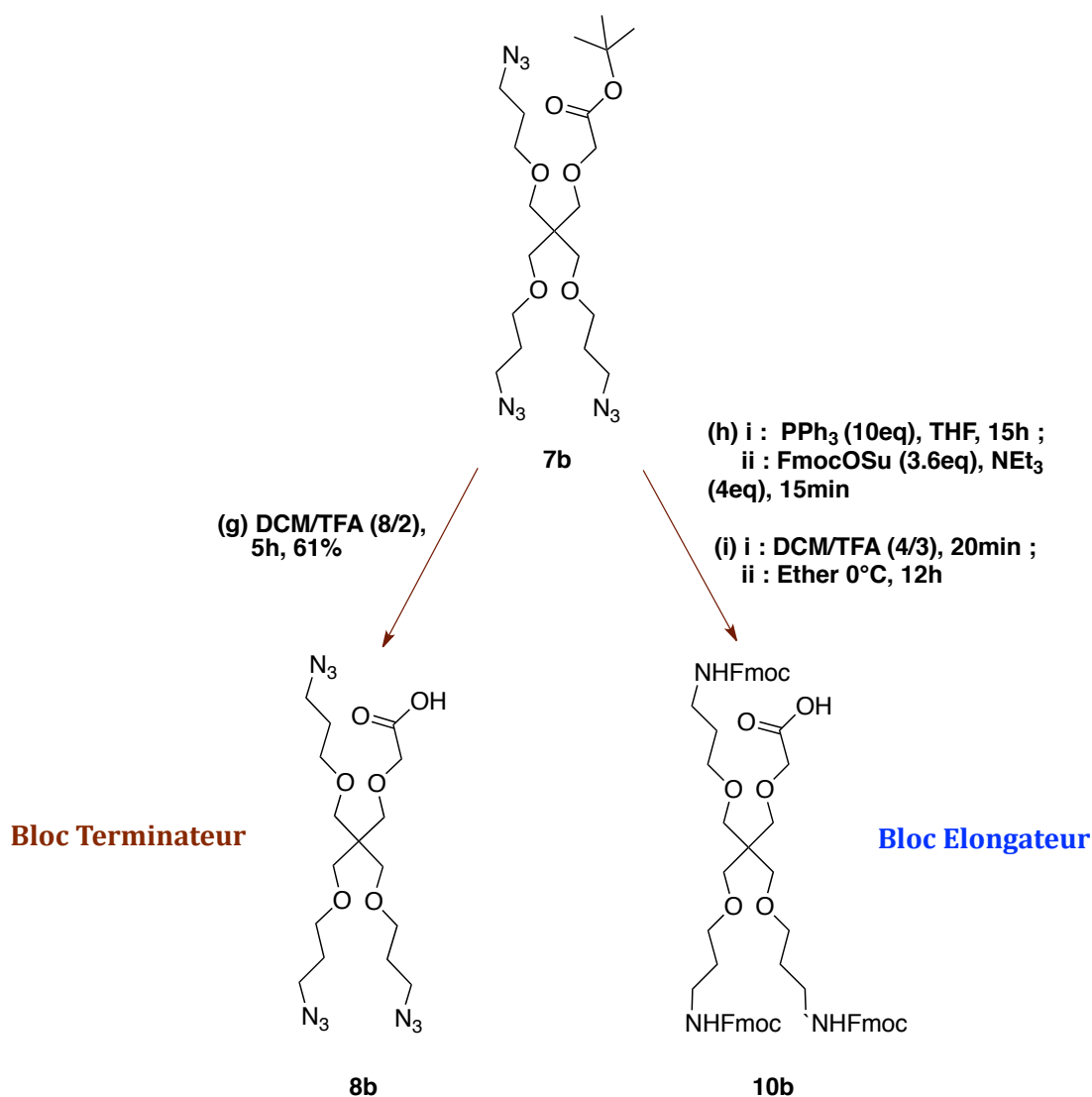


Figure 66 - Schéma de synthèse de **8b** et **10b**, respectivement le bloc Elongateur et Termineur issus du pentaérythritol, à partir de l'intermédiaire **7b**.

La stratégie de synthèse développée sur l' α -D-glucopyranoside de méthyle a ainsi bien marché donnant le bloc Termineuse **8b** et Elongateur **10b** bien que le rendement global de ce premier bloc soit plus bas que celui attendu, de 5% sur 8 étapes et de 16% en omettant la première étape.

B. Synthèse des blocs basés sur le D-mannitol

Le D-mannitol a deux alcools primaires, permettant d'y fixer sélectivement des groupements trityle. Deux blocs ont alors été imaginés (cf. Figure 67), un venant du D-mannitol monotritylé **2c** qui permettrait d'avoir deux branches supplémentaires par rapport aux autres structures vues et donc d'augmenter la valence par génération plus rapidement ; et un autre venant du D-mannitol bitritylé **2d** qui permettrait d'avoir une branche supplémentaire avec en prime deux branches différentes pouvant être exploitées par la suite.

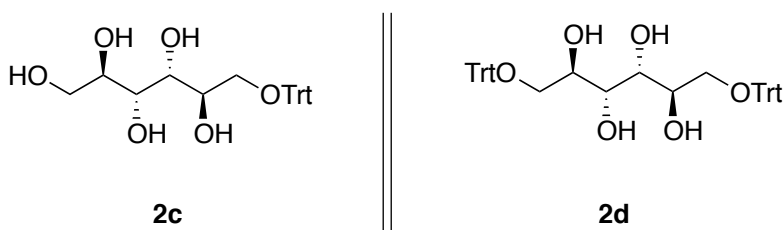


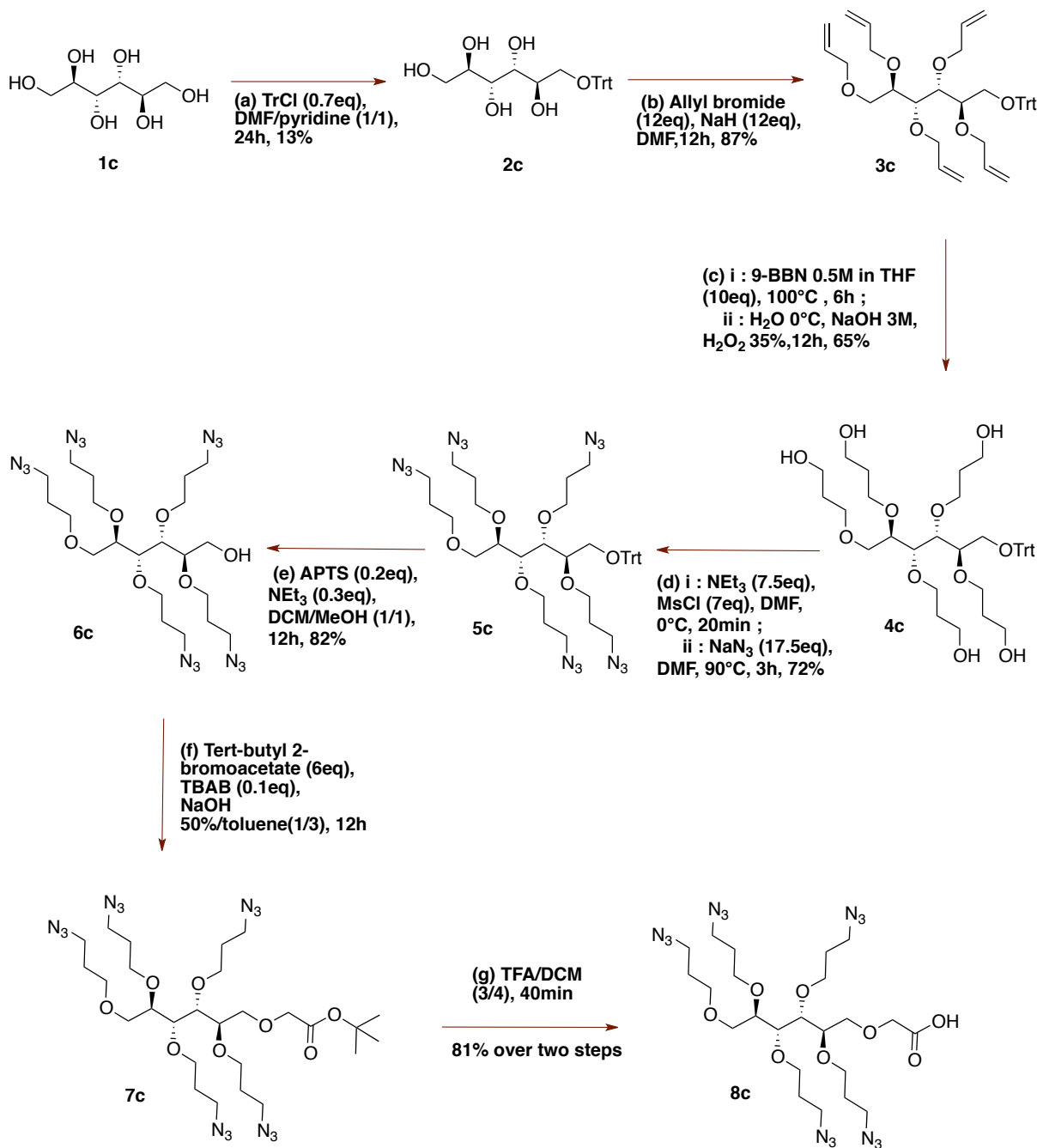
Figure 67 - D-mannitol monotritylé à gauche, et D-mannitol ditritylé à droite.

1. Synthèse du bloc basé sur le D-mannitol à 5 branches similaires (cf. Figure 68)

Une adaptation de la première étape a été nécessaire pour la monotritylation du D-mannitol en **2c**. Le nombre d'équivalents devait être réduit à 1 voire moins pour s'arrêter à la monotritylation, 0.7 équivalent a été choisi. Ce qui implique un changement de purification : de la cristallisation à chaud on passe à une purification sur silice. Cependant, un rendement assez bas a été obtenu (13%).

Les deux branches supplémentaires rendant plus dure la finalisation de certaines réactions, des ajustements des équivalents par fonction par rapport au bloc exemple ont

du être faits. Ainsi pour s'assurer de la finition de la per-allylation de **2c** en **3c**, le nombre d'équivalents par fonction a été augmenté de 1.5 à 2.4 et a donné un très bon rendement de 87%.



Bloc Terminateur

Figure 68 - Schéma de synthèse de **8c**, du bloc Terminateur issu du D-mannitol.

La per-hydroboration suivante a été faite dans les conditions du bloc exemple donnant **4c** avec un rendement de 65%. Dans ces conditions, une purification sur silice du produit a été nécessaire, une quantité plus importante de 9-BBN pourrait éviter cette étape supplémentaire.

La mésylation-azidation de **4c** en **5c** ainsi que la déprotection de l'alcool primaire pour donner **6c** n'ont pas posées de problèmes. Leurs rendements, respectivement de 72% et 82%, sont comparables à ceux de l' α -D-glucopyranoside de méthyle.

Une alkylation a ensuite été faite pour donner **7c**, la purification a été faite sommairement avant de passer à la réaction de déprotection de l'acide carboxylique donnant **8c** avec un rendement de 81% sur deux étapes.

Pour cette structure, l'interprétation des RMN du proton est assez compliquée, les réactions entraînant une disymétrie de la molécule. Leurs analyses ont donc été faites à partir de la RMN du carbone.

La stratégie de synthèse développée pour l' α -D-glucopyranoside de méthyle a marché donnant le bloc Termineur **8c** avec un rendement global de 3.5% sur 8 étapes et de 27% en omettant la première étape. Pour l'instant, le bloc Elongateur n'a pas synthétisé du fait des problèmes survenus pour les autres structures. Une autre stratégie de synthèse des glycodendrimères se passant de ce bloc a été envisagée, en attendant, le bloc synthétisé pourra être utilisé en tant que bloc Termineur pour diversifier la structure des glycodendrimères issus de l' α -D-glucopyranoside de méthyle ou du pentaérythritol.

2. Synthèse du bloc basé sur le D-mannitol à 4 branches similaires (cf. Figure 69)

La bitritylation du D-mannitol en **2d** a été faite dans les mêmes conditions que le bloc exemple c'est-à-dire avec 1.1eq de chlorure de trityle dans de la pyridine par fonction de type alcool primaire, à 100°C pendant 3h. Cependant, la forte température appliquée n'a pas été supportée par le réactif et un rendement faible a été obtenu (39%). Ce dernier a été élevé à 61% lors du remplacement du chauffage par un temps de réaction plus long suivant le protocole d'Alonso-López et al.¹⁴⁵.

Les équivalents ont été adaptés aux nombres de fonctions. Cette fois-ci la purification lors de l'étape de per-hydroboration a pu être évitée avec les conditions du

bloc exemple (2 équivalents par fonction). Ainsi, les trois étapes de per-hydroboration, per-mésylation et per-azidation, ont été faites à la suite pour donner **5d** avec un rendement convenable de 58%.

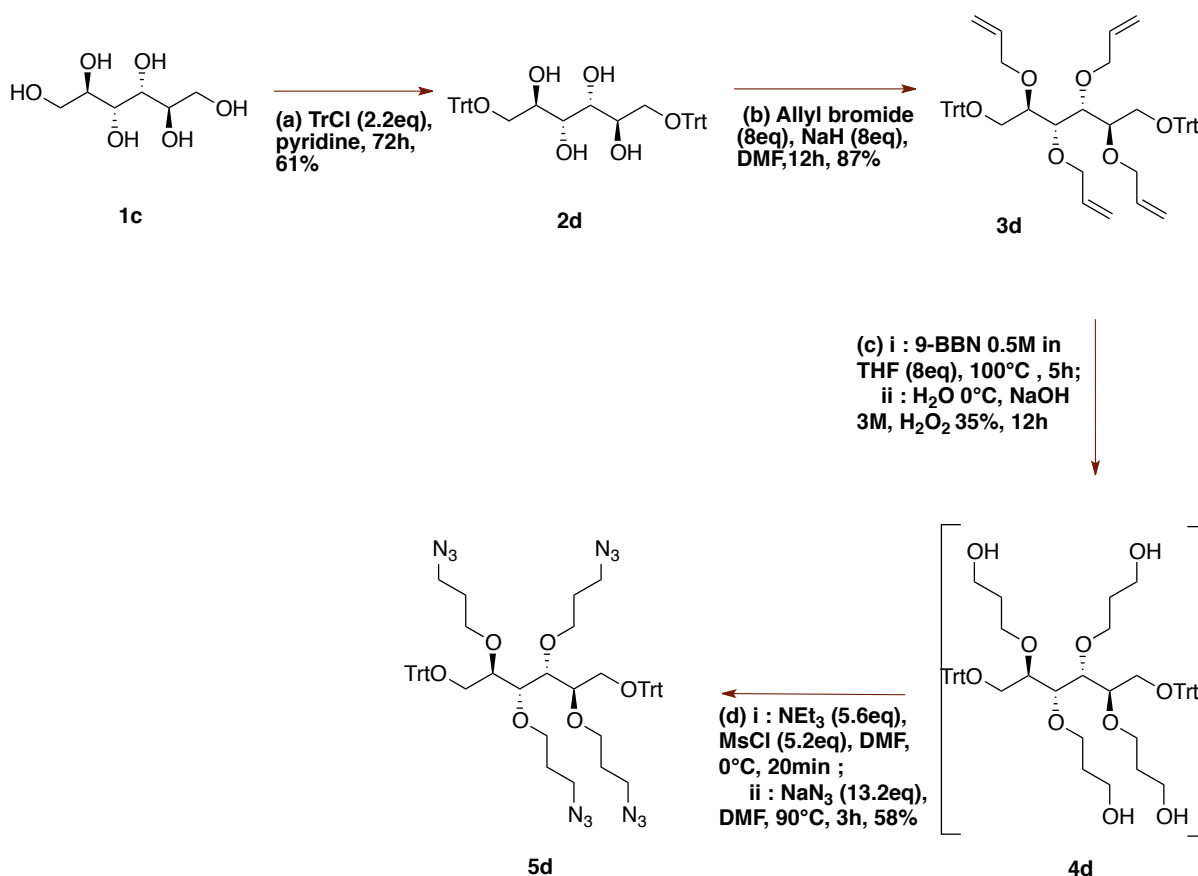


Figure 69 - Schéma de synthèse de **5d**.

La stratégie de synthèse développée pour l' α -D-glucopyranoside de méthyle a donné **5d** avec un rendement global satisfaisant de 31% sur 5 étapes. Les blocs Termineuse et Elongateur n'ont pas été synthétisés pour pouvoir moduler **5d** suivant les résultats de la synthèse solide obtenus.

Trois monomères différents ont donc été modifiés en bloc Elongateur et Termineuseur : l' α -D-glucopyranoside de méthyle qui a servi d'exemple, le pentaérythritol et le D-mannitol. Ils ont donné respectivement **8a** et **10a**, **8b** et **10b** et enfin **8c** (cf Tableau 2).

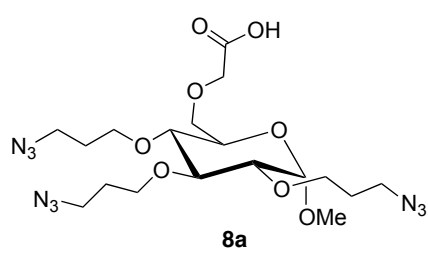
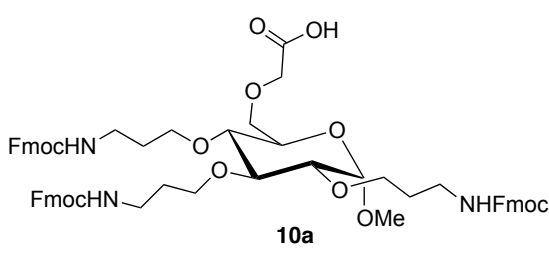
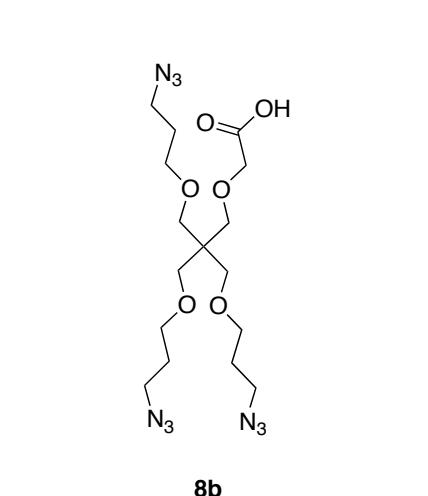
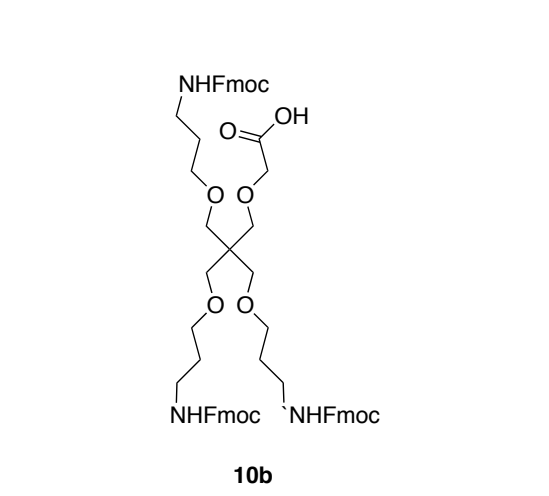
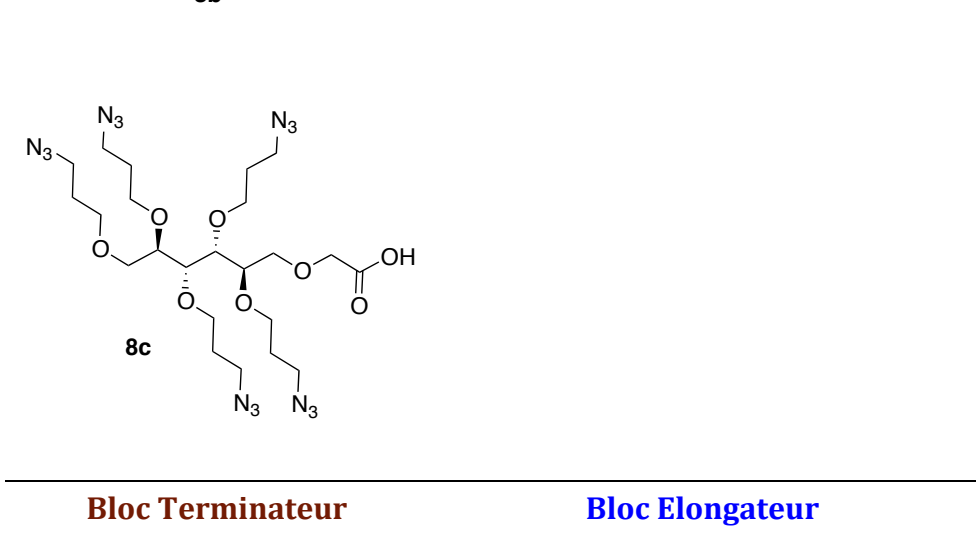
 <p>8a</p>	 <p>10a</p>	<p>Blocs issus de l'α-D-glucopyranoside de méthyle</p>
 <p>8b</p>	 <p>10b</p>	<p>Blocs issus du pentaérythritol</p>
 <p>8c</p>		<p>Bloc issu du D-mannitol</p>
<p>Bloc Termineuseur</p>	<p>Bloc Elongateur</p>	

Tableau 2 - Les différents blocs synthétisés.

IV. Synthèse de la partie saccharidique du dendrimère

La partie saccharidique est composée d'un L-fucose, mieux reconnus par DC-SIGN que les mannoses, et d'une fonction alcyne pour relier ce motif au dendrimère par une CuAAC. Cette dernière est introduite par une chaîne propargylée sur le carbone anomérique.

L'intermédiaire voulu pour la CuAAC est acétylé. De ce fait, la voie de synthèse à partir du L-fucose entièrement per-acétylé a été envisagée comme ce fut le cas pour la synthèse du mannose propargylé synthétisé dans le laboratoire.

Dans le cas d'un monosaccharide per-acétylé, l'acétate voisin du carbone anomérique participe à la réaction en formant l'intermédiaire acyloxonium entraînant, l'attaque du côté équatorial, donnant majoritairement l'anomère β . Cependant, dans le cas du fucose, le méthyle en position 6 stabilise le carbocation formé, engendrant une anomérisation et, lors de temps de réactions long, la formation de l'anomère thermodynamiquement favorable, l'anomère α (cf. Figure 70).

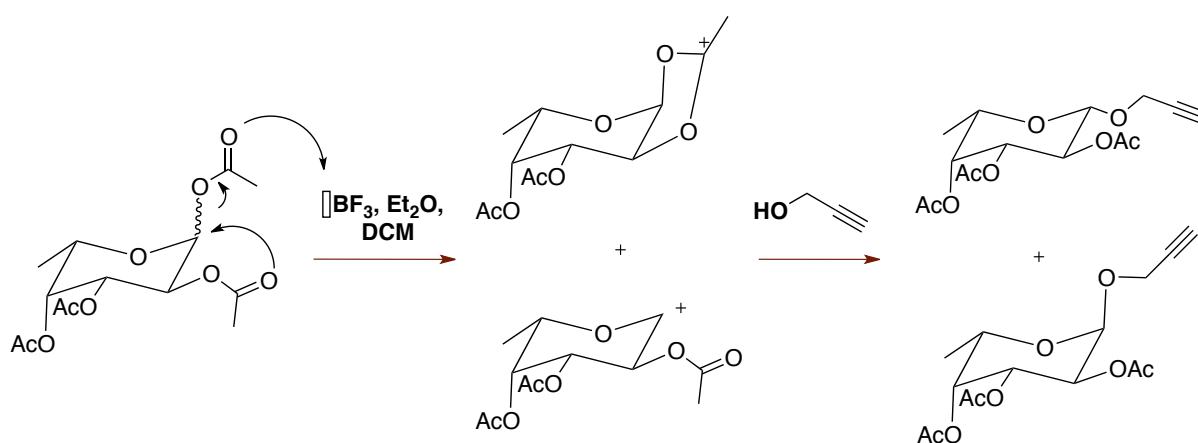


Figure 70 - Mécanisme de glycosylation en passant par l'intermédiaire per-acétylé sur du fucose.

Wang et al. ont expérimenté cette observation en faisant réagir du L-fucose et du triéthylèneglycol fonctionnalisé par une alcyne. Un rapport α/β de 52/48, avec un rendement de seulement 24% pour l'anomère α a été trouvé¹⁴⁶. Néanmoins, DC-SIGN ne reconnaît que l'anomère α des motifs saccharidiques et bien qu'un ratio plus important de cet anomère a pu être obtenu avec des temps de réaction long, il n'est pas suffisant.

Pour éviter le passage par d'autres groupements protecteurs, l'utilisation d'acide sulfurique immobilisé sur silice ($\text{H}_2\text{SO}_4\cdot\text{SiO}_2$) a été choisie^{147, 148, 149}. En effet, une glycosylation de Fisher à partir de sucres libres grâce à ce catalyseur a été décrite par Mukhopadhyay et al.¹⁵⁰. Cette technique permet d'avoir majoritairement l'anomère α (12 :1) en des temps de réaction relativement courts, sans l'utilisation de micro-onde et avec des rendements convenables (74% après acétylation). De plus, la purification est rapide, une simple filtration doit être faite pour enlever l'alcool propargylique en excès.

Ainsi de l'acide sulfurique immobilisé sur silice a été préparé puis directement mis en réaction avec du L-Fucose et de l'alcool propargylique pour donner **22** avec un rendement de 64% (cf. Figure 71).

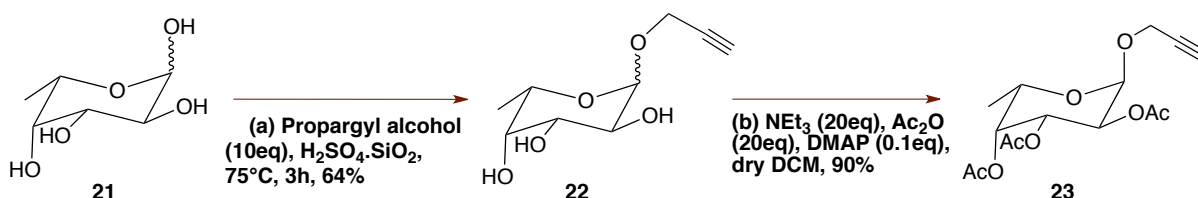


Figure 71 - Synthèse du L-fucose propargylé.

Différentes conditions ont été essayées (cf. Tableau 3) donnant des rendements assez disparates, les conditions de l'entrée 3 ont été retenues pour la suite. On peut noter que certains laboratoires ont eu des problèmes de reproductibilité^{151, 152}.

Entrée	H ₂ SO ₄ .SiO ₂ (rapporté à 500mgFuc)	T° (°C)	Alcool propargylé (eq)	Rendement
1	16mg	65	5	38%
2	16mg	85	5	44%
3	32mg	75	10	61%
4	96mg	75	15	64%

Tableau 3 - Différentes conditions de réaction de glycosylation essayées avec le catalyseur H₂SO₄.SiO₂ pour obtenir **22**.

S'ensuit l'acétylation des groupements restant avec des conditions classiques de triéthylamine, d'anhydride acétique dans du DCM. Une purification sur silice a permis de séparer les anomères et de recueillir que l' α , c'est-à-dire **23**, avec un rendement de 90% (cf. Figure 71).

Dans le cas de CuAAC nécessitant cela, une partie du produit a été désacétylé grâce à de l'hydroxyde de potassium dans de l'éthanol pour donner **24** (cf. Figure 72).

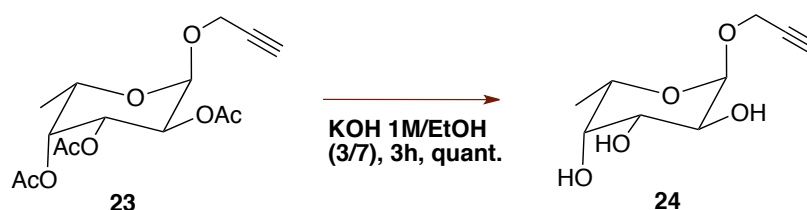


Figure 72 - Désacétylation de **23**.

V. Conclusion

Une stratégie de synthèse de glycodendrimères pouvant être appliquée à différents monomères a été développée. Elle se repose sur l'assemblage de trois types de blocs : un bloc Elongateur, un bloc Termineur et une partie saccharidique.

Le premier, finissant par des amines protégées, permet d'augmenter la génération du dendrimère par couplage peptidique, et le second, finissant par des azotures, permet de décorer le dendrimère final par des saccharides modifiés.

Leurs synthèses ont été développées sur l' α -D-glucopyranoside de méthyle et appliquées avec succès sur d'autres monomères : le pentaérythritol et le D-mannitol ayant 5 branches similaires. La partie saccharidique, quant-à-elle, est composée d'un L-fucose modifié par une alcyne en vue d'une CuAAC avec les dendrimères.

Chapitre II.

Synthèse supportée

La stratégie de synthèse sur support solide a été essayée sur les blocs précédemment synthétisés, **8a** et **10a** issus de l' α -D-glucopyranoside de méthyle. Deux dendrimères ont été synthétisés, un de valence 9 et un autre de valence 27. Une CuAAC a été faite directement sur le support solide pour donner les glycodendrimères correspondants. Les problèmes de purification et de caractérisation survenus ont été surmontés pour le glycodendrimère de valence 9.

Des changements de stratégie de synthèse ont été abordés pour améliorer son efficacité et optimiser les blocs nécessaires.

I. Préparation de la résine et synthèse des générations

A. Généralités

1. Synthèse phase liquide vs synthèse en phase solide

Il existe deux principales méthodes de synthèse peptidique : la synthèse en phase liquide et celle supportée.

La synthèse peptique en phase solide (SPPS) a été proposée pour la première fois en 1962 par Merrifield. Elle est basée sur l'addition séquentielle d'acides aminés protégés sur un support polymérique insoluble. Ce support possède des sites réactifs qui vont réagir avec le C-terminal du premier acide aminé du peptide voulu.

Cette dernière possède des avantages non négligeables. En effet, l'excès de réactifs et de sous-produits pourra être éliminé par de simples lavages, ce qui évite de multiples et longues purifications par colonne chromatographique ou par HPLC mais aussi permet de minimiser la perte de produit. De plus, la synthèse supportée a l'avantage de pouvoir être automatisée. C'est pourquoi, en dehors des synthèses sur grande échelle, elle est préférentiellement utilisée.

Les étapes d'une SPPS, représentées sur la Figure 73, correspondent :

1. A la préparation de la résine : un allongement des chaînes constituant la résine utilisée, une première déprotection si nécessaire et les lavages classiques (le solvant utilisé dans la synthèse, du DCM, du MeOH puis le solvant utilisé dans la synthèse).

2. Au premier couplage peptidique : activation de l'acide aminé, couplage peptidique avec des agents de couplages décrits ultérieurement et des lavages classiques. Une protection des sites n'ayant pas réagi est obligatoire pour cette étape.

3. A la déprotection du peptide en formation, à des lavages classiques, puis l'activation et le couplage de l'acide aminé suivant.

Cette étape est répétée pour différents acides aminés jusqu'à l'obtention du peptide voulu.

4. Enfin au clivage et déprotection des chaînes latérales.

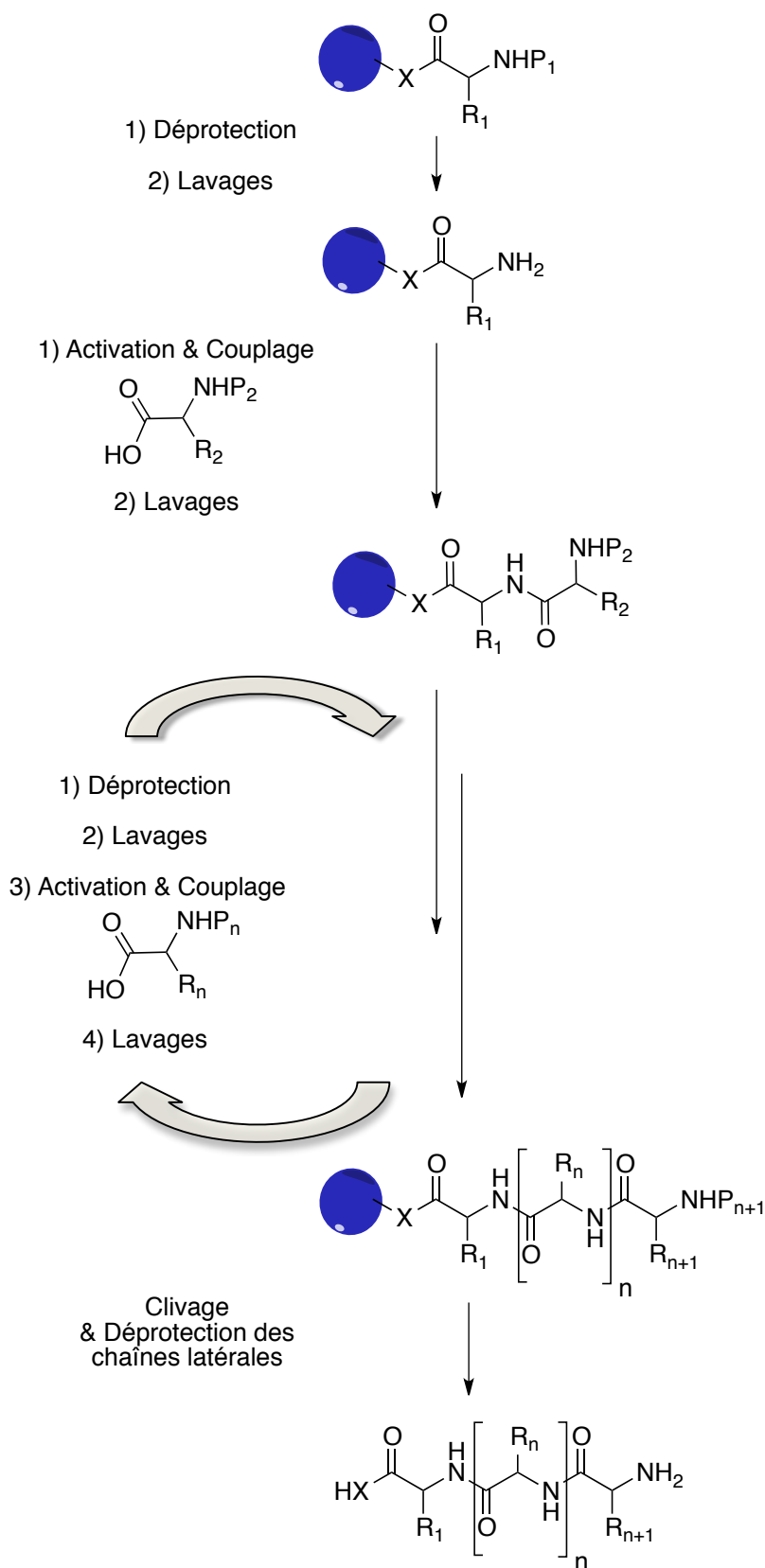


Figure 73 - Principe de la SPPS. (X=NH ou O suivant la résine utilisée).

2. Stratégie Boc/Bzl vs Fmoc/tBu

Pour faire une SPPS il faut en premier choisir entre deux stratégies : la stratégie Boc (tert-butyloxycarbonyl) ou la Fmoc (*N*- fluorenylmethoxycarbonyl).

La stratégie Boc est basée sur une différence de labilité acide des groupements protecteurs. En effet, le groupement Boc est sensible aux acides tel que du TFA dilué dans du DCM tandis que le clivage de la résine et des groupements protecteurs des chaines latérales se fait par un acide tel que l'acide fluorhydrique (cf. Figure 75). Ce dernier peut engendrer la détérioration d'un peptide ayant des séquences fragiles. De plus, sa manipulation est assez délicate, toxique et demande un matériel coûteux fait en polytétrafluoroéthylène (Téflon) qui limite l'utilisation actuelle de cette stratégie.

La stratégie Fmoc est basée sur une protection orthogonale. Le groupement Fmoc est sensible aux bases comme la piperidine, ce qui permet d'utiliser des résines clivables avec des acides moins forts que dans le cas précédent, on utilise en général du TFA ou du TFA dilué dans du DCM (cf. Figure 74).

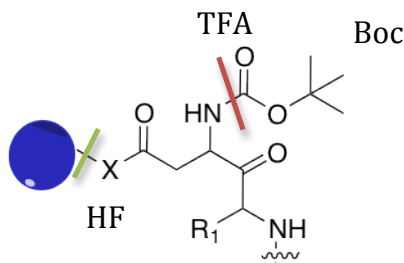


Figure 75 - Clivage et déprotection avec la stratégie Boc.

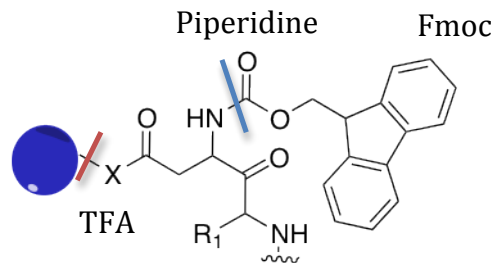


Figure 74 - Clivage et déprotection avec la stratégie Fmoc.

3. Choix du support solide

Il existe de nombreux supports solides. Ils diffèrent par leur matrices (PS, PA ou PEG) et par le lien qu'ils vont faire avec le premier acide aminé (lien amide ou lien acide).

Les résines de polyamide (PA) ou de polyéthylène glycol (PEG), tel que Tentagel®, ont des capacités de chargement d'acide aminé plus faibles que les résines de polystyrène (PS) réticulées à 1% en divinylbenzène (DVB). Elles sont donc plutôt utilisées en synthèse en flux continu ou pour des peptides ayant des séquences difficiles.

La fonction C-terminale (C-term) du peptide voulu détermine le lien du premier acide aminé et donc le choix de la résine. En effet, pour avoir une fonction acide carboxylique en C-term, le premier acide aminé sera lié par un lien ester et une résine telle que la Wang sera donc utilisée (cf. Figure 76). En revanche, pour avoir une fonction amine, un lien amide sera utilisé, ce qui impliquera, par exemple, l'utilisation d'une résine de type Rink amide (cf. Figure 77).

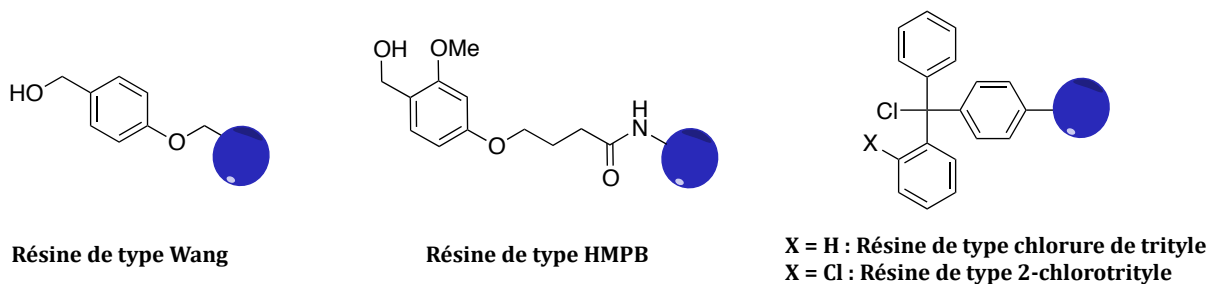


Figure 76 - Exemple de résines pour la synthèse d'un peptide avec une fonction acide carboxylique en C-term.

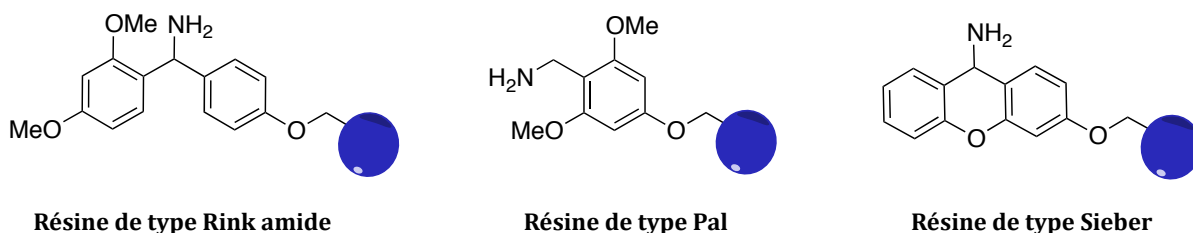


Figure 77 - Exemple de résines pour la synthèse d'un peptide avec une fonction amide en C-term.

On note parmi ces résines la 2-chlorotrityle (2-CTC) qui permet d'obtenir, suivant les conditions de clivage, le peptide entièrement déprotégé ou que partiellement. Dans le cas d'une solution très diluée de TFA dans du DCM (0.8%), le peptide sera bien clivé de la résine mais un groupement protecteur tel qu'un trityle d'une cystéine restera¹⁵³.

4. Solubilité

99% des sites réactifs ne se situent pas en surface mais dans la matrice de la résine. Cela implique qu'en augmentant le volume du polymère composant la résine, on aura une meilleure perméabilité des acides aminés *N*-protégés et donc un meilleur rendement et des temps de réactions plus courts. Il est donc nécessaire de commencer la SPPS en allongeant la résine avec un solvant approprié et d'adapter les réactions avec les solvants les plus efficaces. Le facteur d'allongement typique pour des résines

réticulées avec du polystyrène 1% est listé en Figure 78. Les solvants de plus bas facteurs sont appelés mauvais solvants tandis que ceux de plus hauts facteurs sont appelés bons solvants¹⁵⁴.

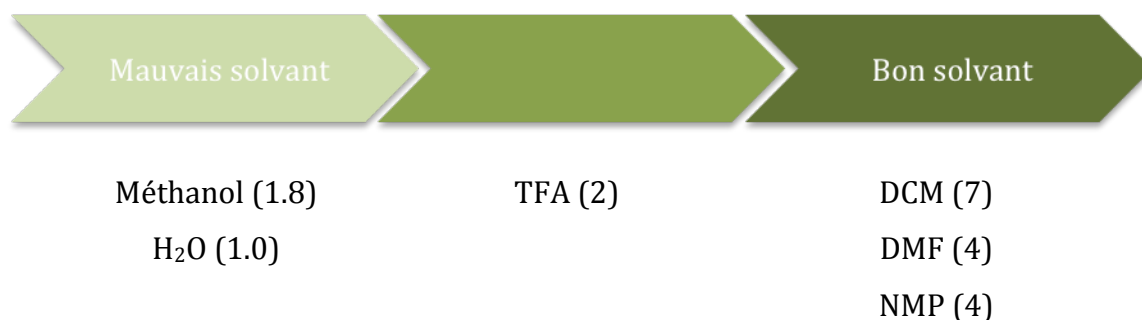


Figure 78 - Liste de solvants rangés par leur facteur d'allongement en mL/g précisé entre parenthèses.

5. Agents de couplages

Un couplage peptidique nécessite au préalable une activation de l'acide carboxylique de l'acide aminé *N*-protégé par un groupement partant plus efficace (cf. Figure 79). Ces activateurs, toujours plus performants, permettent d'améliorer le rendement de séquences difficiles et de diminuer le taux d'épimérisation de l'acide aminé *N*-protégé lors de son activation (cf. Figure 80).

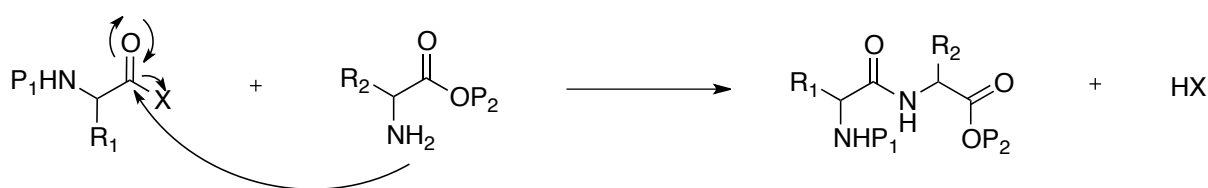


Figure 79 - Réaction de couplage peptidique (P1 et P2 des groupements protecteurs, X groupement partant, R₁ et R₂ quelconques).

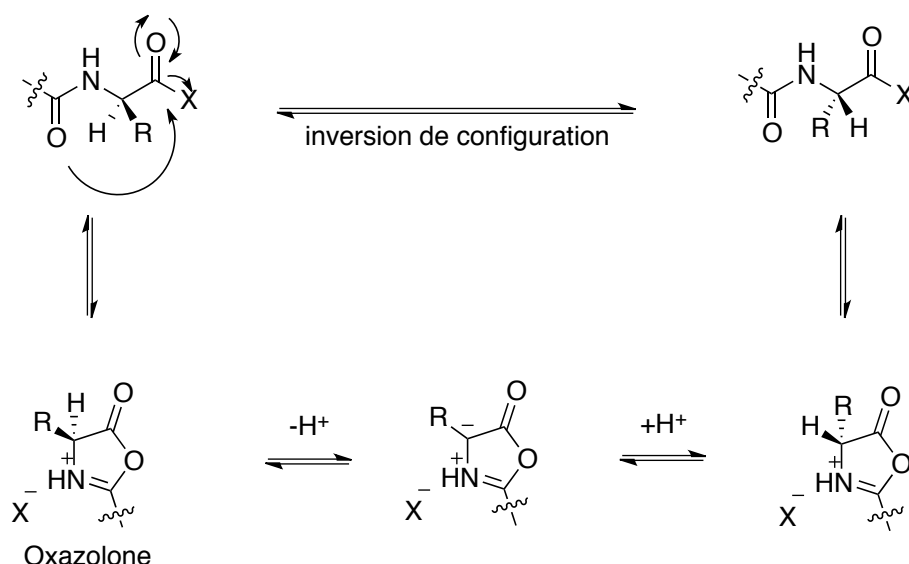


Figure 80 - Réaction d'épimérisation d'un acide aminé *N*-protégé lors de son activation.

Les plus anciens sont les anhydrides, seuls les mixtes, tel que l'anhydride issu de l'isobutyl chloroformate, sont toujours utilisés. Normalement, un seul acide aminé *N*-protégé réagit pour former un anhydride avec deux sites activés, C₁ et C₂ de la Figure 81. Ils sont donc attaqués sans préférence, stoppant un grand nombre de sites du peptide en construction. Dans le cas de l'anhydride issu de l'isobutyl chloroformate, le site C₁ est préférentiellement attaqué, limitant la perte de produit.

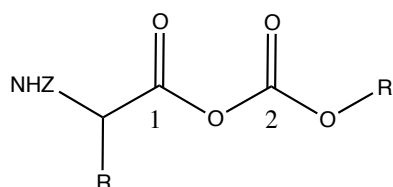


Figure 81 - Méthode d'activation utilisant une anhydride mixte (Z est l'acide aminé *N*-protégé, R est, R' quelconques).

L'arrivée des carbodiimides a permis de diversifier les techniques d'obtention des peptides. L'un des plus connu est le *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (DCC). Cette méthode d'activation a de nombreuses réactions secondaires. Tout d'abord, l'intermédiaire *O*-acyluré peut se réarranger en *N*-acyluré inactif, ce qui implique une perte d'acide aminé *N*-protégé et donc une diminution du rendement de la réaction (cf. voie A sur la Figure 82). Ensuite, un second acide aminé *N*-protégé peut attaquer l'*O*-

acyluré formant l'anhydride symétrique et ainsi augmentant l'épimérisation (cf. voie C sur la Figure 82).

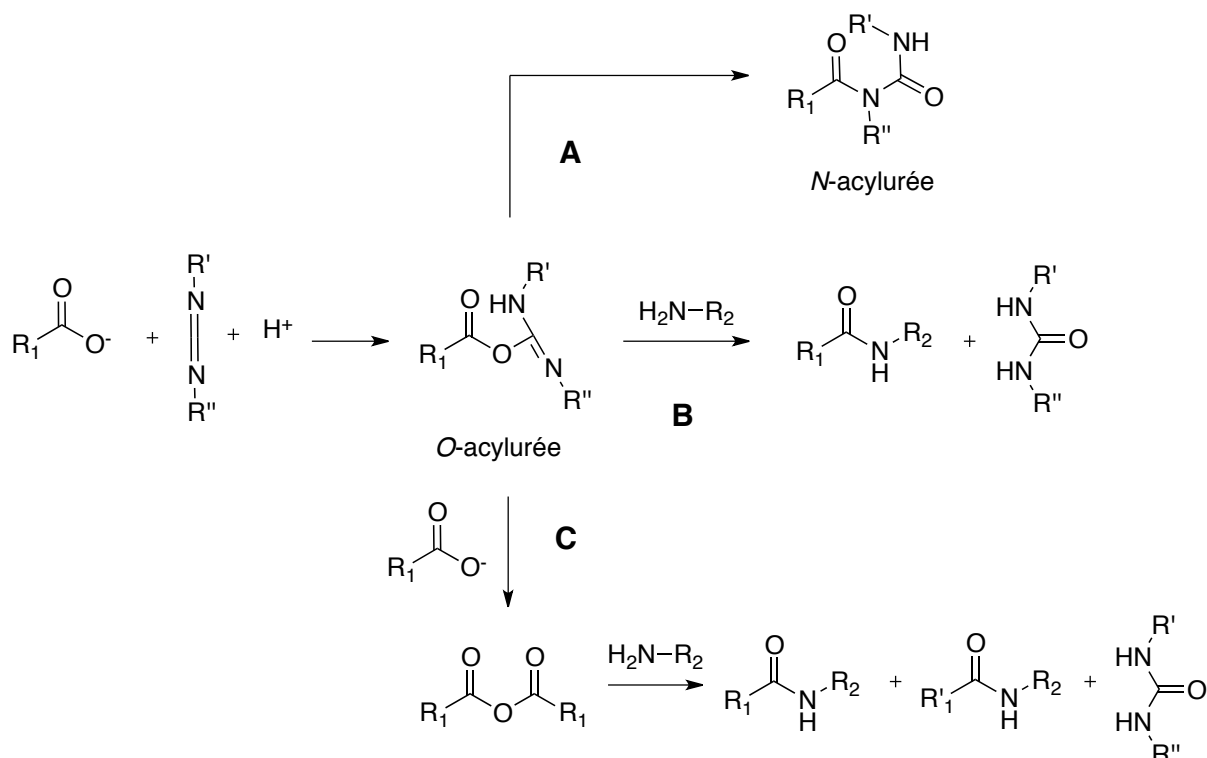


Figure 82 - Différentes réactions de couplage peptidique activées par du DCC - voie A : réarrangement en N-acyluré ; voie B : formation du peptide voulu ; voie C : formation de l'anhydride sachant que R₁' est l'épimère de R₁.

Pour diminuer, voire éliminer ces réactions indésirables, le carbodiimide est associé avec un auxiliaire nucléophile tel que l'1-hydroxybenzotriazole (HOBt) qui va protoner l'O-acyluré et ainsi empêcher son réarrangement. L'1-hydroxy-7-azabenzotriazole (HOAt) est utilisé pour des séquences plus difficiles car l'assistance de l'azote pyridinique le rend plus efficace.

Avec la découverte de l'HOBt, des essais pour des agents de couplages à base de sels de phosphonium ont été effectués sur des analogues. Ce qui donna en 1975, la découverte du benzotriazol-1-yl-oxytris-(diméthylamino) phosphonium hexafluorophosphate (BOP)¹⁵⁵. Malheureusement, la réaction utilisant cet agent engendre un sous-produit toxique, l'hexaméthylphosphoramide. Une alternative fut trouver seulement en 1990 avec la découverte du benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidino phosphonium hexafluorophosphate (PyBOP), non toxique¹⁵⁶. De nouvelles molécules

semblables et encore plus efficaces ont été découvertes depuis telle que le 7-Azabenzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidino phosphonium hexafluorophosphate (PyAOP).

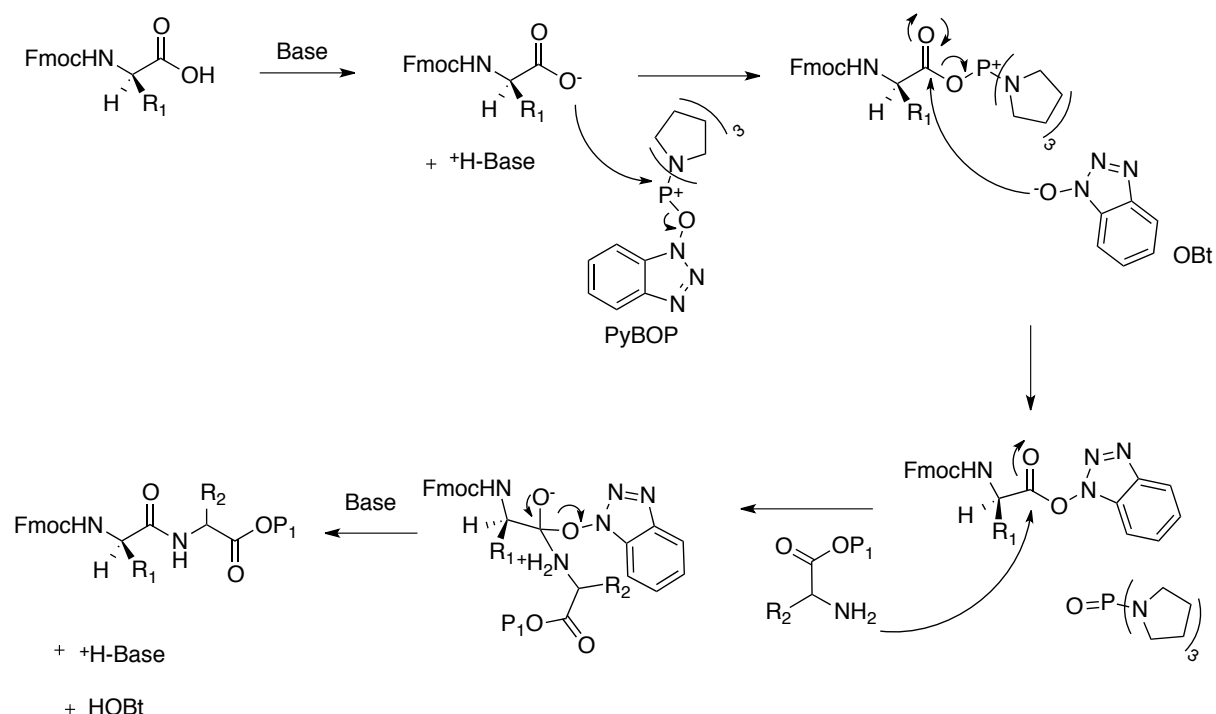


Figure 83 - Couplage peptidique avec activation par PyBOP/HOBt.

Le mécanisme de couplage peptidique par activation de sels de phosphonium débute par une déprotonation de l'acide carboxylique de l'acide aminé *N*-protégé par une base non secondaire comme la *N,N*-diisopropyléthylamine (DIPEA) pour ne pas déprotéger l'amine. Ensuite cette espèce va attaquer le phosphore positivement chargé de l'agent de couplage, PyBOP est pris en exemple sur la Figure 84. Le groupement OBt libéré va attaquer l'ester et libérer le groupement phosphonium pour donner l'ester activé OBt. Ensuite, l'amine du peptide en construction peut attaquer l'ester et sous l'action d'une base et d'un réarrangement, finir le couplage peptidique.

Les sels d'uronium/ammonium fonctionnent de la même manière que les sels de phosphonium exceptés qu'ils peuvent bloquer de manière irréversible l'amine libre du peptide en construction en formant avec lui des dérivés guanidylés. En effet, ils sont connus pour être des agents de guanidylation (cf. Figure 83).

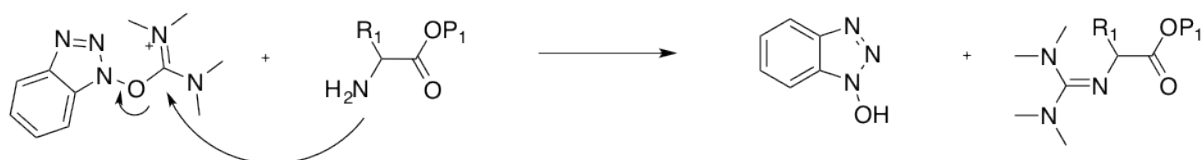


Figure 84 - Réaction secondaire de guanidylation de TBTU

Pour éviter cela, deux précautions peuvent être prises : activer séparément l'acide aminé *N*-protégé avant de l'ajouter à la résine et ajouter un des auxiliaires nucléophiles mentionnés auparavant.

Parmi ces sels, on note les plus classiques *O*-(Benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium hexafluorophosphate (HBTU) et *O*-(Benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium tetrafluoroborate (TBTU) et leurs analogues plus efficaces 1-[Bis(dimethylamino)methylene]-1*H*-1,2,3-triazolo[4,5-*b*]pyridinium 3-oxid hexafluorophosphate (HATU) et *O*-(6-Chlorobenzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium hexafluorophosphate (HCTU).

Un récapitulatif des différents agents de couplage et auxiliaires nucléophiles mentionnés ci-dessus ainsi que leurs structures et leurs nom au complet est présenté dans le Tableau 4.

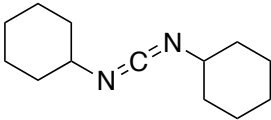
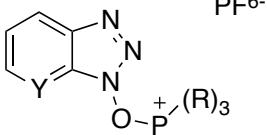



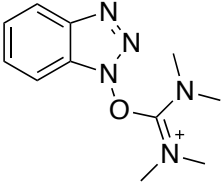
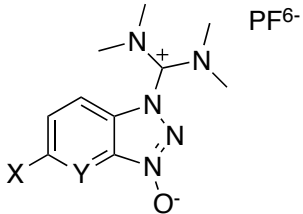
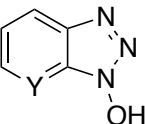
Carbodiimides		
DCC	<i>N,N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimide	
Sels de phosphonium		
BOP	Benzotriazol-1-yl-oxytris-(dimethylamino) phosphonium hexafluorophosphate	 PF ⁶⁻
PyBOP	Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidino phosphonium hexafluorophosphate	BOP; R =  ; Y=C
PyAOP	7-Azabenzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidino phosphonium hexafluorophosphate	PyBOP; R =  ; Y=C PyOAP; R =  ; Y=N
Sels d'uronium		
HBTU	<i>O</i> -(Benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium hexafluorophosphate	 Z
TBTU	<i>O</i> -(Benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium tetrafluoroborate	HBTU ; Z=PF ⁶⁻ TBTU ; X=BF ⁴⁻
Sels d'ammonium		
HATU	1-[Bis(dimethylamino)methylene]-1 <i>H</i> -1,2,3-triazolo[4,5- <i>b</i>]pyridinium 3-oxid hexafluorophosphate	 PF ⁶⁻
HCTU	<i>O</i> -(6-Chlorobenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethylaminium hexafluorophosphate	HATU ; X=H, Y=N HCTU ; X=Cl, Y=CH
Auxiliaires nucléophiles		
HOBT	1-Hydroxybenzotriazole	 HOBT; Y=CH
HOAt	1-Hydroxy-7-azabenzotriazole	HOAt; Y=N

Tableau 4 - Récapitulatif des agents de couplages et auxiliaires nucléophiles mentionnés dans le chapitre.

6. Séquences difficiles

Certaines séquences peuvent être plus dures à effectuer, de nombreux facteurs peuvent être modifiés pour améliorer le rendement :

- la méthode de synthèse,
- la résine,
- les solvants,
- l'acide aminé/protection de la chaîne latérale de celui-ci,
- Les agents de couplages,
- Le cocktail de clivage,
- La purification.

B. Préparation du monomère de départ

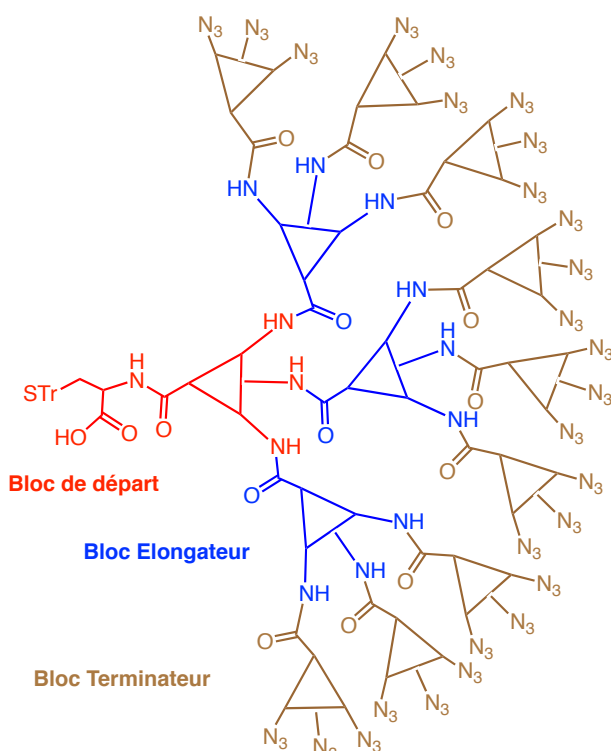


Figure 85 - Représentation du dendrimère voulu.

Le dendrimère final doit avoir une fonction supplémentaire, un thiol par exemple, pour permettre une future fonctionnalisation. Il est préférable que celle-ci soit protégée pour éviter d'éventuelles interactions supplémentaires dans les premières études d'interaction biologique comme la formation de ponts disulfures par exemple.

C'est ainsi que, la résine de type 2-chlorotrityle a été choisie (cf. Figure 86). Grâce à une modulation de la proportion de TFA dans du DCM, le dendrimère peut être clivé soit avec ou sans la protection du thiol.

Ainsi, une cystéine dont les amines sont protégées avec des groupements Fmoc et le thiol avec un trityle a été d'abord mise sur la résine avant de mettre le premier bloc Elongateur (cf. Figure 87). Ce premier acide aminé permet à la fois d'espacer le dendrimère de la résine mais aussi de changer le loading initial de la résine. En effet, vu l'encombrement du dendrimère, il est préférable de diminuer ce dernier de 1.8 mmol/g à 0.2 mmol/g.

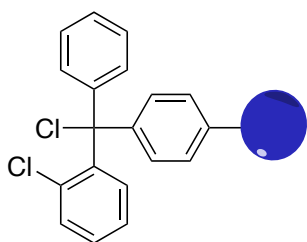


Figure 86 - Résine de type 2-CTC.

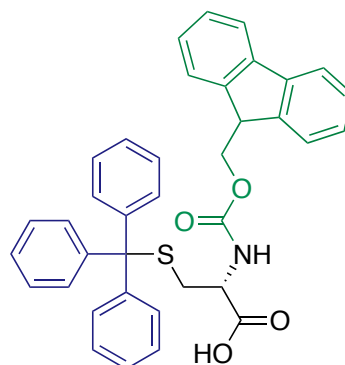


Figure 87 - Fmoc-Cys(Trt)-OH.

L'acide aminé a été ainsi préparé au préalable dans du DIEA/DCMsec puis ajouté à la 2-CTC sèche pendant plusieurs heures. S'ensuit la protection de tous les chlores n'ayant pas réagit pour les rendre non réactifs aux futurs couplages. Pour cela, ils sont substitués par des fonctions methoxy grâce à du DCM/MeOH/DIEA (17 :2 :1).

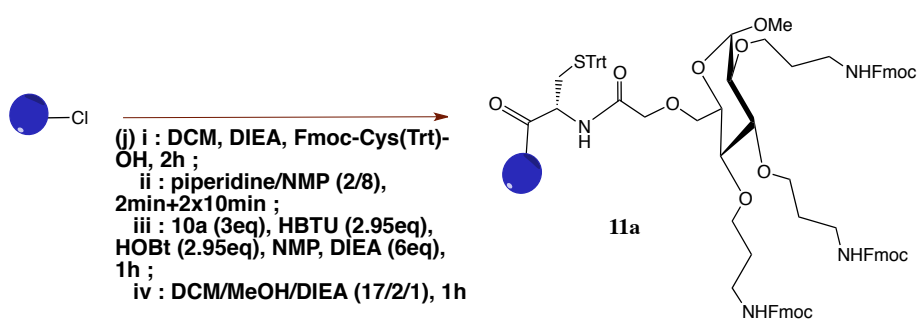


Figure 88 - Préparation du bloc de départ issu de l' α -D-glucopyranoside de méthyle.

Chaque réaction a été faite sur 250 mg de résine portant une cystéine, pour être à une quantité de mole de départ de 0.05 mmol.

L'amine de la cystéine a été ensuite déprotégée grâce à un mélange de piperidine/ *N*-méthyl-2-pyrrolidone (NMP) (2/8). Le couplage peptidique suivant a été fait avec le

bloc Elongateur, pré-activé grâce à de l'HBTU, de l'HOBt et de la DIEA dans du NMP, pour donner **11a**, le bloc de départ (cf. Figure 88).

C. Synthèse des générations

Suivant le principe de la synthèse divergente, le choix de la valence voulue détermine le prochain couplage peptidique. En effet, pour une valence de 9, le couplage suivant se fera avec le bloc Terminateur tandis que pour une valence de 27 ou plus, il se fera avec le bloc Elongateur.

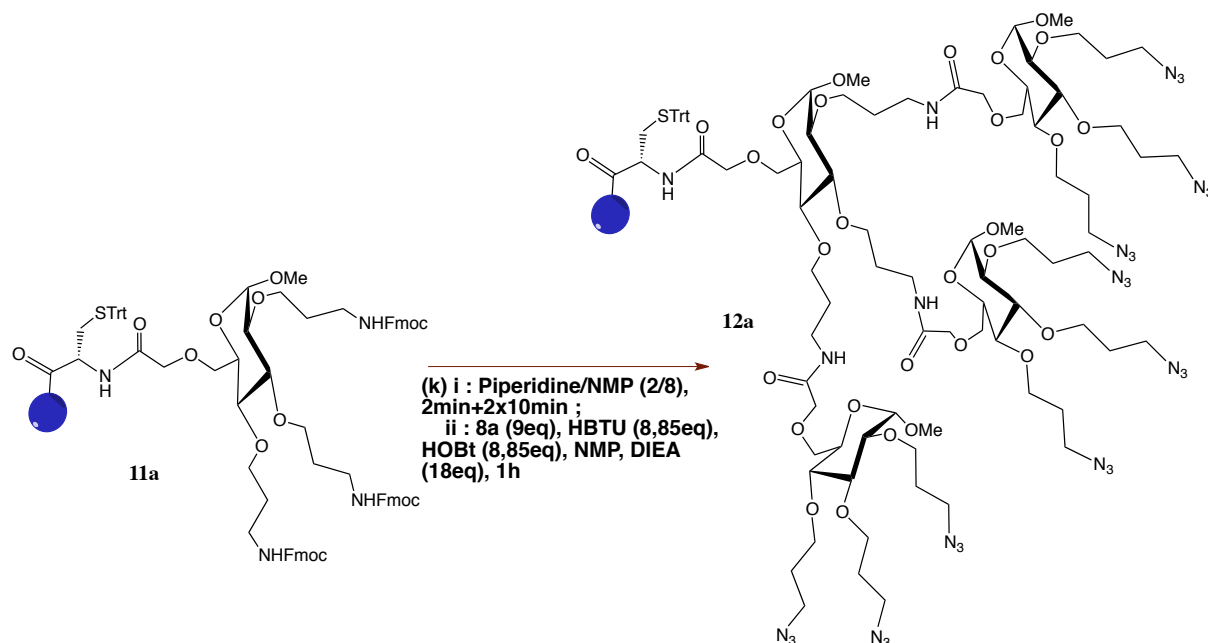


Figure 89 - Schéma de synthèse de 12a.

Après déprotection et vérification par un test de Kaiser, le couplage suivant a été fait avec les mêmes agents de couplages qu'auparavant en multipliant le nombre d'équivalents par le nombre de branches du dendrimère en construction. Les deux réactions types sont représentés en Figure 89 pour le dendrimère de valence 9 et Figure 90 pour le dendrimère de valence 27 ou plus.

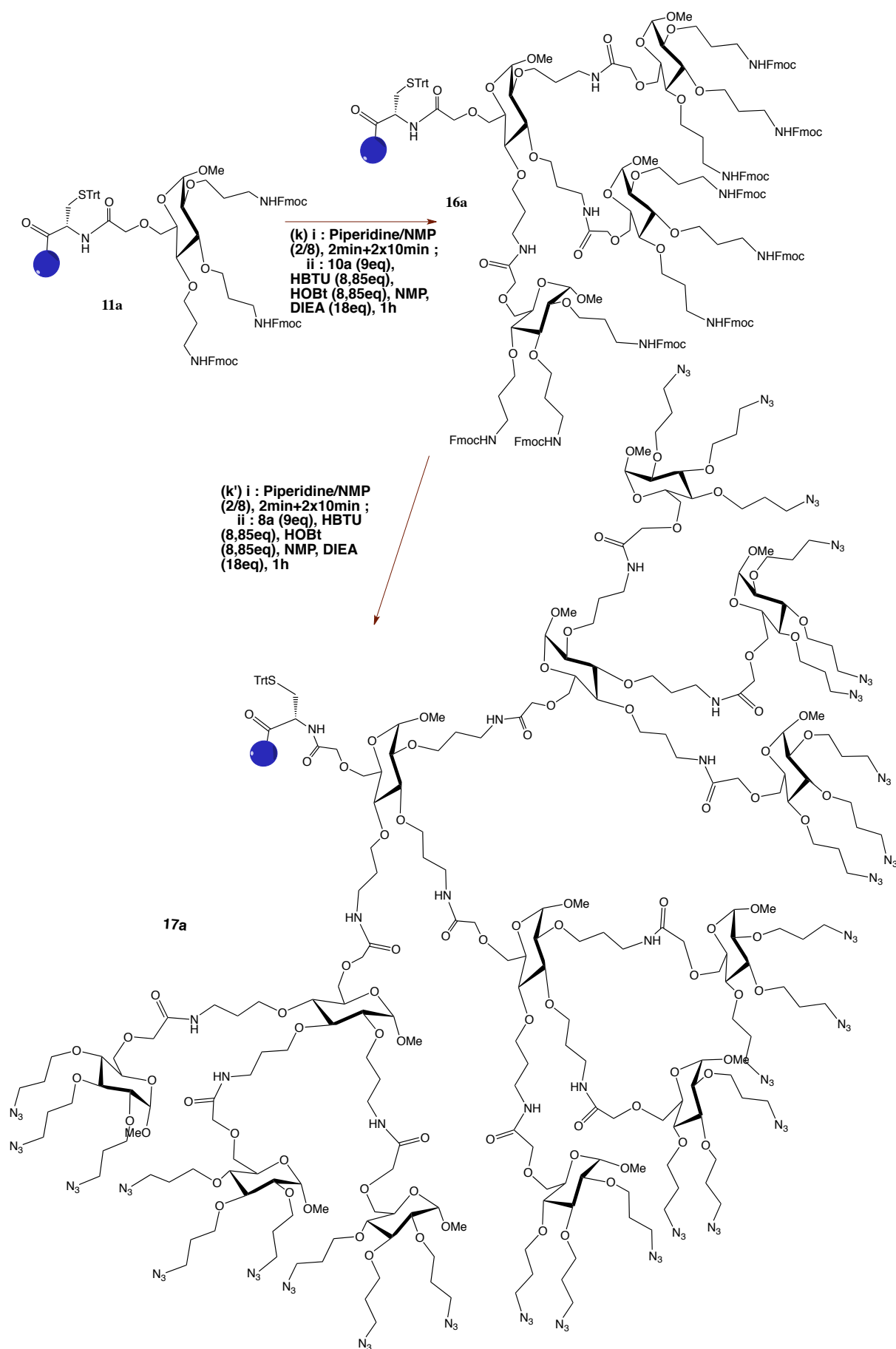


Figure 90 - Schéma de synthèse de 17a.

Le test de Kaiser est un test qualitatif colorimétrique détectant la présence ou l'absence d'amines sur des supports solides. Il est particulièrement utilisé lors des étapes de protection et de déprotection d'une SPPS. Quelques gouttes de trois solutions (une solution de ninhydrine, une de phénol et une autre de cyanure) sont mélangées à quelques billes de résines puis le mélange est chauffé quelques minutes. Des billes bleues indiquent un test positif, c'est-à-dire des amines libres.

Des résultats non concluant ont parfois été trouvés lors des tests de Kaiser des couplages peptidiques engageant des azotures. Suspectant des réactions non finies, les réactions ont alors été relancées avec de nouveaux réactifs, cependant aucun changement des tests n'a été remarqué. Il a été observé que les azotures perturbent le test classique de Kaiser. Celui-ci a alors été interchangé avec un légèrement modifié: 2 gouttes de 5% PPh_3 dans du THF et 2 gouttes d'eau ont été ajoutées au test habituel. Après un chauffage à 200°C pendant 5 minutes, les billes deviennent bleues en présence d'azotures au lieu de jaunes avec un test de Kaiser normal¹⁵⁷.

II. Accrochage du saccharide final

A. Click, généralités

1. Spécificité

Depuis sa description en 2001 par K. B. Sharpless, H. Kolb et M.G. Finn¹⁵⁸, la chimie "click" rencontre un succès impressionnant. Il s'agit d'un concept ne représentant pas seulement une réaction mais un groupe de réactions ayant les spécificités suivantes :

- avoir de hauts rendements,
- avoir un champ d'application vaste,
- être stéréospécifique,
- générer que des sous-produits inoffensifs qui peuvent être éliminés par des méthodes non-chromatographiques, et
- être simple à mettre en place.

2. Cycloaddition 1,3-dipolaire alcyne- azoture (AAC)

Malgré leurs grandes stabilités envers un grand nombre de conditions standard en synthèse organique, les azotures n'ont fait que de pauvres apparitions en synthèse organique avant le développement de la chimie "click". Ils ont été principalement utilisés *in situ* pour introduire un azote via une azidation et une réduction en amine. Cela est probablement dû à des problèmes de sécurité lors de leurs manipulations. En effet, un bon nombre d'azotures métalliques sont sensibles aux chocs et certains organiques, tout particulièrement les plus petits, sont aussi explosifs. On peut noter que l'azoture de sodium est relativement sans danger tant qu'il n'est pas mis en présence d'acide où il serait sous la forme HN_3 , volatile et très toxique¹⁵⁹.

Huisgen a participé à ces apparitions en découvrant^{160, 161, 162} une nouvelle réaction en 1962¹⁶³ : une cycloaddition 1,3-dipolaire entre un azoture et un alcyne pour générer un 1,2,3-triazole. Dans ces conditions, le système devait être chauffé à de hautes

températures entraînant une faible régiosélectivité avec un mélange de 1,4 et 1,5 triazoles.

Une variante de cette réaction, appelée "Copper(I)-catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition" (CuAAC), fait son apparition en 2002 parmi les réactions "click". Elle utilise une catalyse au cuivre I pour diminuer l'énergie d'activation de la réaction de telle sorte que cette dernière puisse se faire à température ambiante (cf. Figure 91)¹⁶⁴. L'augmentation de la vitesse de réaction catalysée est multiplié par $\approx 10^7$ et découle de la formation du seul régioisomère 1,4. Cette conversion est maintenue lors de l'utilisation de micro-onde ou de températures plus élevées.

Bien que seul le Cuivre I soit catalytiquement actif, différentes sources de cuivre peuvent être utilisées et ont été rassemblées par Meldal et al.¹⁶⁵, du :

- Cu^0 en présence de sulfate de cuivre, soit
- Cu^I (CuBr , CuI ,...) en présence d'une base (NEt_3 , 2,6-lutidine, ...) et sous atmosphère inerte (sauf en cas d'ajout de ligands azotés polydentés, cf. II.A.3), soit
- Cu^{II} (CuSO_4 , Cu(OAc)_2 , ...) en présence d'un réducteur tel que l'acide ascorbique ou l'ascorbate de sodium pour avoir l'état d'oxydation +1 du cuivre.

Tandis que l'espèce Cu^I est directement générée par la réduction avec l'ascorbate et donne immédiatement le complexe Cu-acétylure, le CuI et CuBr ont besoin d'une base aminée, de plus forte température, ou d'une sonification pour obtenir ce complexe¹⁶⁶. Cela pourrait provenir du fait qu'ils soient initialement des clusters stables et qu'ils aient besoin d'une certaine concentration d'anion acétylure avant de former le complexe réactif.

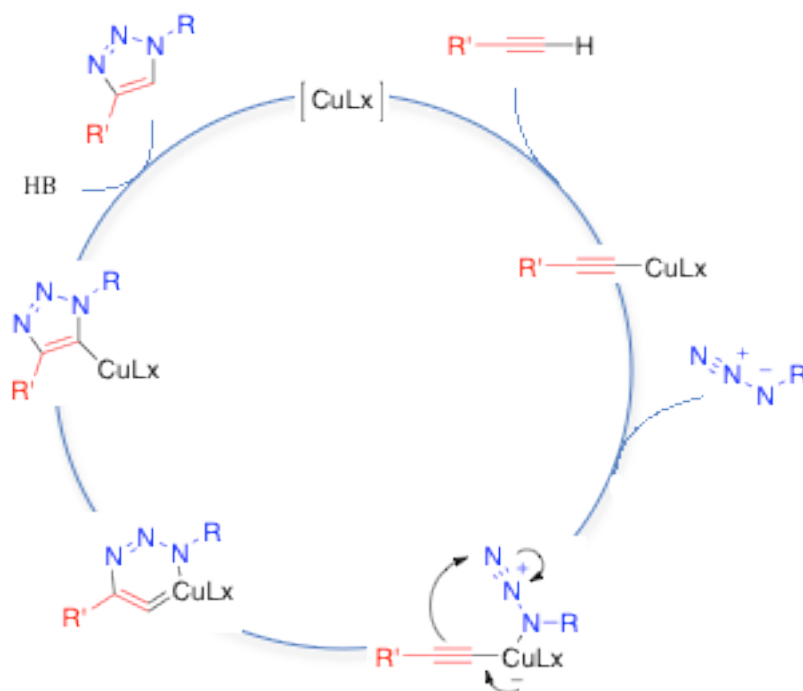


Figure 91 - Mécanisme de la CuAAC.

La CuAAC a vite trouvé sa place dans la synthèse de dendrimères. En effet, le nombre de branches, et donc de réactions simultanées, impose des réactions ayant d'excellents rendements. De plus, la gêne stérique à la périphérie du dendrimère, plus particulièrement pour ceux de générations élevées ou très décorés, rendrait très difficile, voire impossible, l'insertion de fragments volumineux autrement.

Par ailleurs, le régioisomère 1,5 étant plus dur à avoir à cause de la gêne stérique, cela permet de pouvoir augmenter la température de réaction ou d'utiliser le micro-onde sur des durées prolongées sans perdre la régiosélectivité 1,4 de la CuAAC. Ceci peut être utilisé pour compenser la perte de rendement observée lors de l'augmentation en générations de certains dendrimères.

3. Recommandations pour une CuAAC avec des dendrimères

Malgré l'utilisation de plus en plus importante de cette réaction, les conditions classiques de CuAAC, 4eq de sulfate de cuivre/2eq d'ascorbate de sodium dans un solvant aqueux eau/alcool, peuvent parfois échouer, tout particulièrement lors de la synthèse de dendrimères¹⁶⁷. Malheureusement le screening systématique des réactions est rare dans ce domaine, principalement du fait du temps et du coût de la préparation du substrat mais aussi des rendements variant énormément d'une structure à une autre

rendant toute généralisation difficile. Quelques explications à ces échecs peuvent néanmoins être émises.

Tout d'abord, la quantité de catalyseur doit être adaptée au nombre de sites réactifs, ce qui peut amener à des quantités presque stoechiométriques quand on ne regarde qu'un seul site. De plus, une non-normalisation de l'information fait que les auteurs peuvent donner le ratio en pourcentage molaire par site de couplage ou par pourcentage molaire du substrat ou tout simplement ne pas spécifier, laissant une marge de re-optimisation importante.

L'instabilité du Cu^{I} en milieu aqueux peut poser problème, il peut se décomposer en un mélange de Cu^{II} et Cu^0 lors de réactions longues, faisant diminuer le rendement. L'usuel double excès d'ascorbate de sodium peut être élevé à 5 fois pour s'assurer du bon état d'oxydation du cuivre.

Une alternative est l'utilisation de ligands azotés polydentés développés par Fokin et al.¹⁶⁸ tel que le tris(benzyl-1,2,3-triazol-4-yl)méthyl amine (TBTA) (cf. Figure 92). Ils stabilisent le Cu^{I} sans avoir recours à une atmosphère inerte tout en le laissant accessible pour la réaction (cf. Figure 93.). Par ailleurs, ces ligands, donneurs d'électrons, catalysent la réaction en enrichissant le cuivre d'électrons qu'il rendra à l'alcyne en favorisant la formation du complexe acétylénique¹⁶⁹.

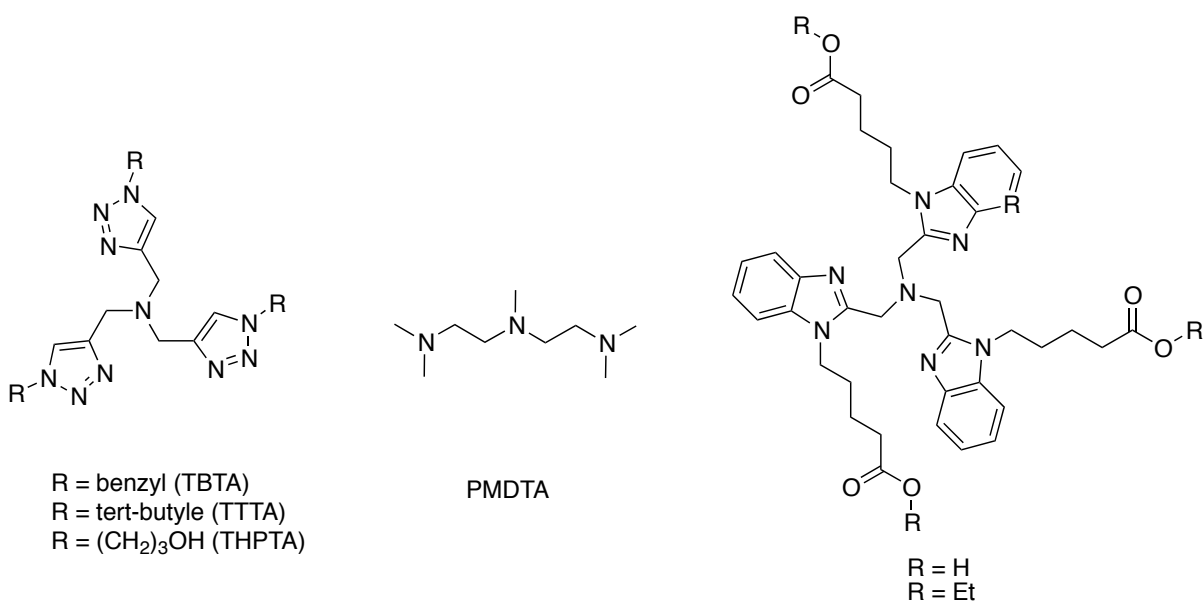


Figure 92 - Exemple de ligands azotés polydentés.

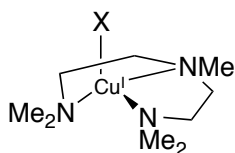


Figure 93 -
[Cu^I(PMDTA)(NX)]⁺.

Matyjaszewski et al. ont comparé l'effet de différents ligands de ce genre sur une CuAAC au CuBr. Ils ont montré, par exemple, une augmentation de la vitesse de réaction de 230 fois grâce au pentamethyldiéthylènetriamine (PMDTA)¹⁶⁹. Cette méthode s'est largement popularisée^{170, 171, 172, 173}.

Dans le cas de substrat poly-acétyléniques flexibles, il a été observé, notamment par Zhao et al., que la proximité des alcynes pouvait engendrer une coordination du cuivre I et saturer rapidement celui-ci^{174, 175}. Le complexe formé est assez stable pour empêcher l'azoture de se lier au cuivre I amenant un rendement médiocre voir nul de la CuAAC. La réaction d'homocouplage et l'oxydation des alcynes sont alors favorisées. Dans leurs travaux, Zhao et al. ont essayé de faire une CuAAC sur une calix[4]arenes portant quatre alcynes. Aucun produit n'a été obtenu malgré le chauffage, qui n'a fait qu'accélérer la sous-réaction d'homocouplage des alcynes. Par contre, en changeant les alcynes par des azotures, le rendement est monté jusqu'à 80%.

Cet homocouplage se passe tant en présence de cuivre I et de dioxygène (réaction de Glaser - Figure 94) qu'en présence de cuivre II (réaction d'Eglinton - Figure 95)¹⁷⁶. Pour le premier cas, travailler en atmosphère inerte ou ajouter de ligands azotés polydentés suffit. Pour le second, on peut doubler la quantité d'oxydant mise usuellement afin de rester dans l'état d'oxydation +1 puis se rapporter à la solution du premier cas¹⁷⁷.

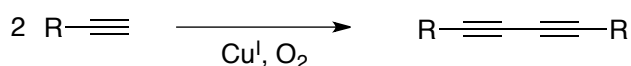


Figure 94 - Réaction de Glaser.

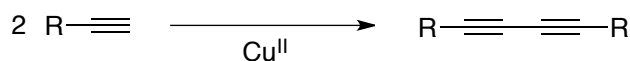


Figure 95 - Réaction d'Eglinton.

Dans le cas où des molécules biologiques (protéines, virus...) participent à la réaction, on ne peut utiliser que de faibles concentrations de catalyseur et une atmosphère ambiante, ce qui fait chuter fortement le rendement. De plus grandes précautions sont à prendre. L'illustration la plus parlante est donnée par Finn et al. et

leurs essais de CuAAC sur des virus de la mosaïque du niébé (CPMV) marqués avec soit 60 azotures, soit 60 alcynes (cf. respectivement Figure 97 et Figure 96)¹⁷⁸.

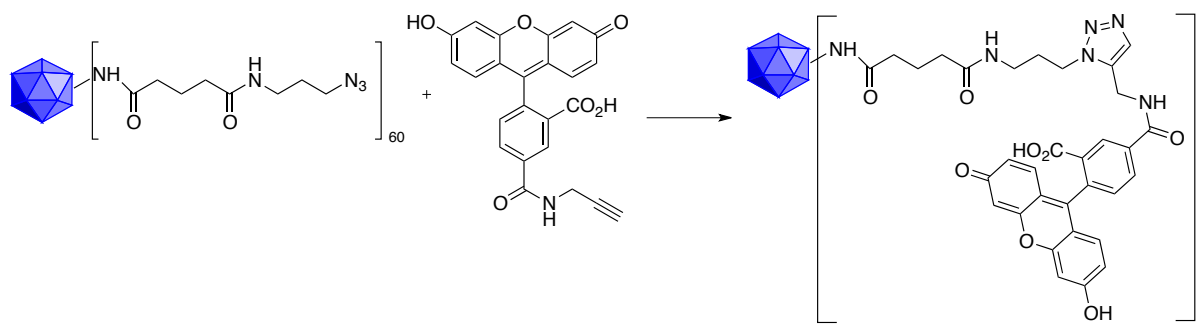


Figure 96 - Réaction A de Finn et al., les conditions se situent dans le Tableau 5.

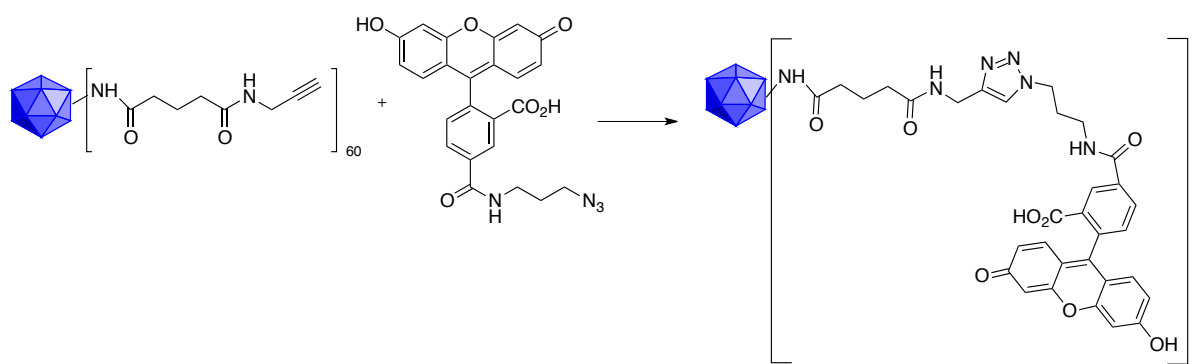


Figure 97 - Réaction B de Finn et al., les conditions se situent dans le Tableau 5.

Le réducteur usuel du Cu^{II} , l'ascorbate, peut désassembler les biomolécules. Parmi les alternatives possibles, ils ont trouvé que l'utilisation de fils de cuivre (Cu^0) ou de Tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP) convenait (cf. entrée 1 et 2 du Tableau 5). Ce dernier est un bon candidat du fait qu'il réagit plus rapidement sur le cuivre que sur les azotures aliphatiques. Cependant, le ratio TCEP/Cuivre est à surveiller car ce réducteur peut se lier au cuivre et ainsi jouer un rôle inhibiteur. L'utilisation des deux réducteurs n'engendre pas de chute de rendement (cf. entrée 5)

Le ligand polydenté TBTA est essentiel à la bonne marche de la réaction, en effet, sans celui-ci la fonctionnalisation des virus peut chuter de 100 à 17% (cf. entrée 3 et 4 versus entrée 1 et 2 du Tableau 5). La décomposition du Cu^{I} est donc à particulièrement surveiller dans ce cas là.

Lorsque les CPMV sont marqués avec des alcynes, on retrouve les problèmes remarqués auparavant, le rendement de la CuAAC chute considérablement par rapport

aux CPMV marqués avec des azotures pourtant, la réaction a été exécutée dans les mêmes conditions (cf. entrée 6 versus 1 du Tableau 5).

Entrée	Réaction	CuSO ₄ (mM)	TBTA (mM)	TCEP (mM)	Cu ⁰	loading
1	A	1.0	2.0		+	60 (100%)
2	A	1.0	2.0	2.0	-	60 (100%)
3	A	1.0		2.0	+	17 (29%)
4	A	1.0		2.0	-	10 (17%)
5	A	1.0	2.0	2.0	+	60 (100%)
6	B	1.0	2.0		+	10 (17%)

Tableau 5 - Quelques conditions de CuAAC essayées par Finn et al. sur les CPMV, 4°C, 16h.

B. CuAAC sur support solide

Généralement, lors d'une CuAAC en phase homogène, un mélange d'H₂O/méthanol est utilisé pour mieux solubiliser les substrats et être dans un milieu favorable¹⁶⁷. Quand on passe en phase solide, ce type de solvant n'est plus adéquat pour la résine ; en effet l'accessibilité des fonctions à réagir dépend de l'allongement de la résine c'est-à-dire de la nature de la résine et des solvants utilisés. Un effort de méthodologie doit donc être fait. Ces résines peuvent être plus ou moins hydrophiles suivant le degré de PEG la constituant.

Les essais de CuAAC sur résine ont très vite démarré après la mise en valeur de cette réaction¹⁷⁹.

1. CuAAC sur des résines à base de Polystyrène

Holub et al. ont eu la possibilité de faire plusieurs CuAAC lors d'allongement de chaîne peptoïde sur une résine de type Rink amide¹⁸⁰. Cependant les quantités de réactifs utilisés sont impressionnantes, 40eq de CuI, 20eq d'acide ascorbique, 50eq de DIEA dans du DMF/pyridine (7/3) mais le plus gênant ce sont les 21eq de réactif azoturé nécessaires pour une seule fonction alcyne. Ces valeurs imposent un réactif de départ peu coûteux et facilement obtainable. Un travail d'optimisation est donc nécessaire.

Plusieurs groupes ont effectué ce travail et ont trouvé que le rendement dépendait du substrat et des conditions de réactions. Zhang et al. ont regardé l'évolution du rendement de CuAAC entre des lysines "azoturées" et des dipeptides liés à une résine de type Rink amide sans exclusion d'oxygène (cf. Figure 98)¹⁸¹. Ils ont remarqué tout d'abord qu'une quantité catalytique de cuivre n'était pas suffisante pour avoir du produit, ils se sont alors basés sur les conditions suivantes : 5eq de produit azoturé, 5eq de CuI, 5eq d'ascorbate de sodium et 10eq de DIEA. Des essais de co-solvant ont ensuite été testés pour essayer de stabiliser le Cu^I, le THF a été remplacé par du DMF/Pyridine (7/3), puis par du DMF/2,6-lutidine (7/3) et enfin par du DMF/Pipéridine (8/2) donnant des rendements respectivement de 0, 82 et 100%. Dans ces conditions, la pyridine est cette fois-ci inefficace. Cornier et al. sont tombés sur les mêmes observations¹⁸². L'amélioration du rendement n'a pas été la seule chose bénéfique de l'utilisation de la pipéridine, le temps de réaction tombe aussi à 5h avec suppression de dépôt de cuivre sur la résine.

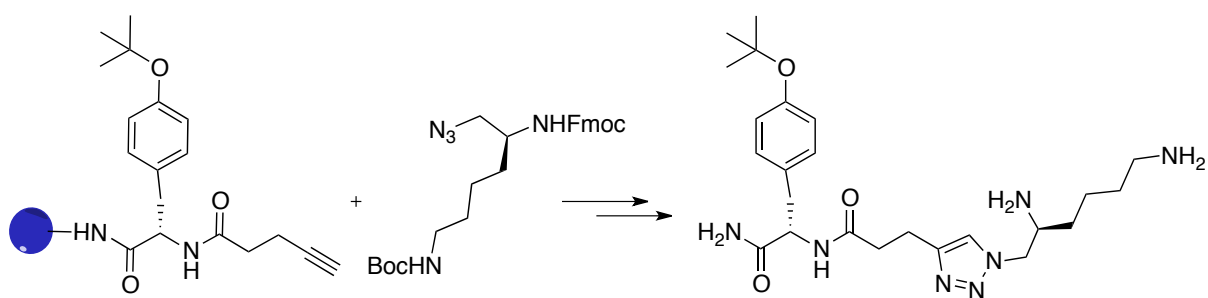


Figure 98 - Réaction modèle des essais de CuAAC par Zhang et al..

Quelques exemples montrent plusieurs CuAAC faites simultanément sur un support solide. Brabez et al. ont adapté le protocole de Zhang et al. avec succès à trois CuAAC simultanées sur un même support solide, de la MBHA¹⁵⁷. Toutes les quantités ont été multipliées par le nombre de fonction en diminuant celles du réactif de départ et de DIEA, respectivement mises à 2 et 7 équivalents par fonction.

2. CuAAC sur des résines à base de Polyéthylène glycol

Dès 2001, Tornøe et al. ont synthétisé différents peptidotriazoles grâce à du CuI/DIPEA (2eq/50eq, et 2eq de réactif azoturé)¹⁷⁷. Deux sortes de résines à base de

polyéthylène glycol ont été testées : de la PEGA₈₀₀ et de la SPOCC. La solvation importante de ces dernières a permis d'éviter le cross-coupling et d'améliorer le rendement. En effet, des conversions supérieures à 95% ont été trouvées pour des puretés allant de 75 à 99%.

Les essais se sont diversifiés avec les résines de type Tentagel S Ram, Franke et al. en ont fait un exemple¹⁸³. Ils ont synthétisé un modèle peptidique cyclique contenant deux lysines protégées l'une par un groupement 4,4-diméthyl-2,6-dioxocyclohex-1-ylidene)-3-méthylbutyl (ivDde) et l'autre par un groupement allyloxycarbonyl (Alloc) et une 4-nitrophénylalanine, trois fonctions orthogonales (cf. Figure 99). Chacune à leur tour, elles vont être déprotégées, couplées à de l'acide propanoïque puis mises en jeu dans les mêmes conditions de CuAAC que l'exemple précédent, CuI/DIEA, dans du DMF. Les CuAAC restent encore assez longues (deux jours) et donnent un rendement global assez faible (6%).

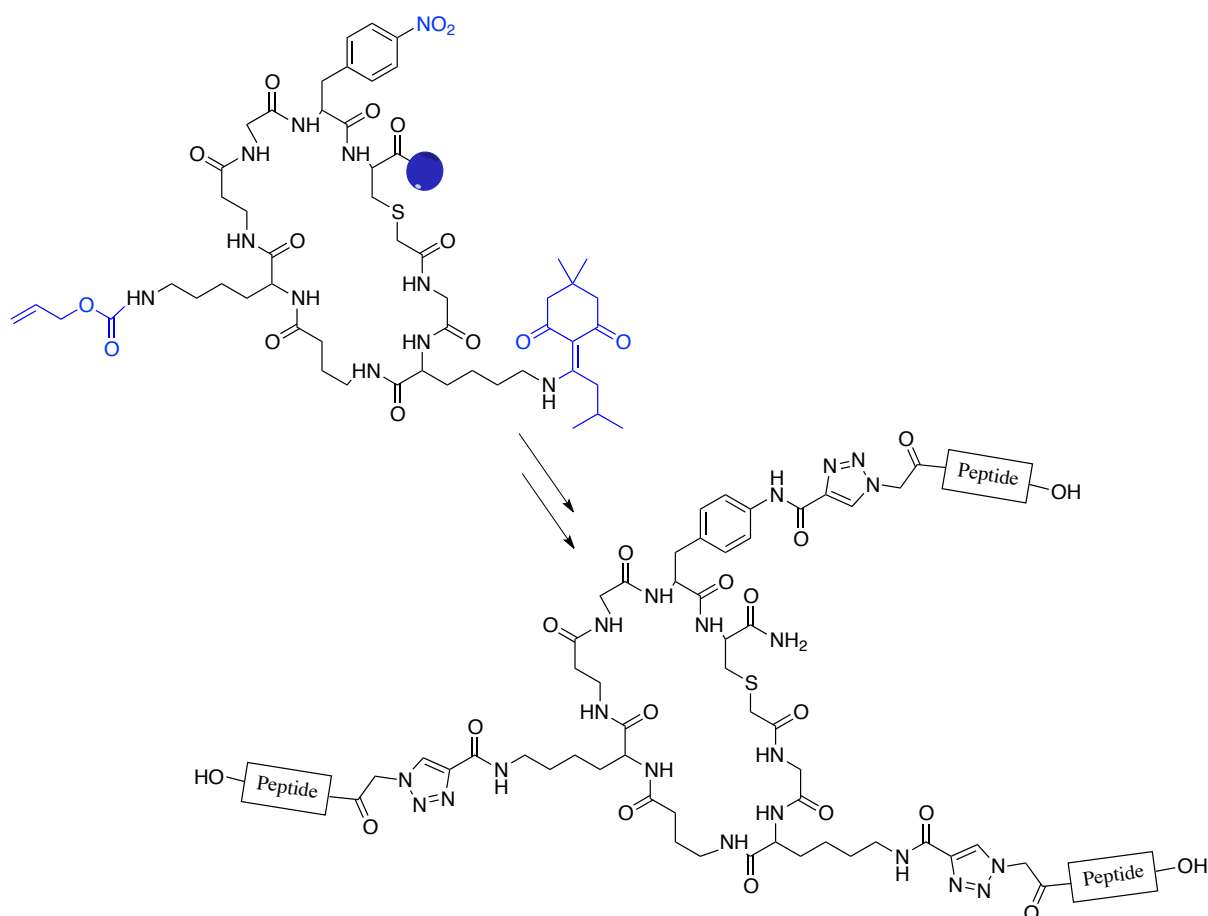


Figure 99 - Triple CuAAC sur une résine de type Tentagel S Ram de Franke et al..

L'optimisation nécessaire des réactions est encore démontrée au vu de l'exemple de Hüttel et al. avec ses dendrons de lysines modifiés portant deux alcynes sur une résine de type Tentagel S Ram¹⁸⁴. Ils ont essayé de multiples conditions de CuAAC basés sur d'autres groupes de recherche^{185, 182, 186, 183, 187}, et donc pour d'autres substrats (cf. Tableau 6) avant d'en trouver une convenable donnant un rendement de 92% : 2eq de réactifs azotés par fonction alcyne avec un cocktail de CuI/DIEA (1.2eq/55eq) dans du DMF.

	Réactifs	Azoture	Solvant	Conditions
1	5eq CuI + 5eq ascorbate de sodium	5eq/alcyne	DMF/Piperidine (4/1)	20h, TA
2	0.5eq CuI + 10eq DIEA	2 eq/alcyne	THF	2h, TA
3	0.5eq Cu(PPh ₃) ₂ NO ₃	3eq/alcyne	NMP	40min, TA
4	1.2 eq CuI + 55eq DIEA	2 eq/alcyne	DMF	2 jours, t°amb, dark
5	5eq CuSO ₄ .H ₂ O + 50eq ascorbate de sodium	1.6 eq/alcyne	THF/H ₂ O (1/1)	10min, 100W, MW, 100°C

Tableau 6 - Différentes conditions de CuAAC essayé par Hüttel et al..

C. Synthèse

La résine utilisée offre le choix d'utiliser deux types de clivage, l'un pour garder le trityle protégeant la cystéine mise sur le bloc de départ, et un autre qui l'enlève. Ce dernier se fait classiquement en présence d'éthanedithiol (EDT), substance qui peut réduire les azotures en amines¹⁸⁸. Des essais sur de petites quantités de résines de dendrimères ayant 9 azotures issus du pentaérythritol et de l' α -D-glucopyranoside de méthyle ont montré que le temps de clivage ne permettait pas de garder toutes les fonctions intactes en quantité suffisante. C'est pourquoi, pour éviter ce problème, le clivage est fait après la CuAAC.

1. Accrochage du saccharide par CuAAC

Les conditions de CuAAC dans la littérature sont très disparates, leurs succès dépendent beaucoup de paramètres comme le substrat. Face aux multiples possibilités, le choix s'est tourné vers les résultats de Lécorché et al.. Ils ont optimisé les conditions d'Holub et al. pour synthétiser un glycopeptide sur une résine de type Rink amide sur un modèle montré en Figure 100¹⁷⁵. Ils ont testé plusieurs sources de cuivre (CuI et $\text{Cu}(\text{OAc})_2$), plusieurs co-solvants (pyridine, 2,6-lutidine et pipéridine), plusieurs nombres d'équivalents de sucre, de DIEA et différents temps de réaction.

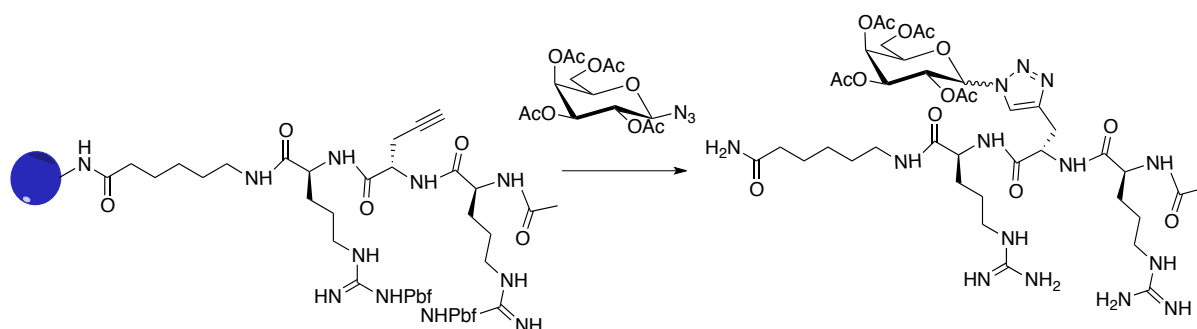


Figure 100 - Réaction modèle de la CuAAC faite par Lécorché et al..

Ainsi, une optimisation des conditions de réaction pour une conversion totale a été trouvée (cf. Tableau 7) : une durée minimale de 5h de réaction, un nombre d'équivalent de DIEA de 5, mais surtout, le plus intéressant, est le nombre d'équivalents de réactifs azotés descendu à 2, essentiel pour des blocs demandant de nombreuses étapes de synthèse comme les nôtres. Quant-à la source du co-solvant, il importait peu sauf pour des temps plus réduit. Ainsi, ces conditions ont été choisies avec du $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ (4eq)/acide ascorbique (2eq) dans un mélange Pyridine/NMP (3/7) (cf. entrée 1 du Tableau 7).

Entrée	Sel de cuivre (eq)/ Ac. ascorbique (eq)	Co-solvant à 30% dans du DMF	Sucre (eq)	DIEA (eq)	Temps (h)
1	$\text{Cu}(\text{OAc})_2$ (4eq)/ Ac. Ascorbique (2eq)	Pyridine	2	5	5
2	CuI (2eq)/Ac. ascorbique (2eq)	2,6-lutidine	4	5	5
3	CuI (2eq)/Ac. ascorbique (2eq)	Pipéridine	4	5	5

Tableau 7 - Conditions de CuAAC de Lécorché et al.

D'après une observation de Lécorché et al., les éléments glycosylés ont été laissés protégés pour la CuAAC afin d'avoir un profil d'HPLC moins complexe en fin de réaction. Les quantités de réactifs ont été calculées par rapport à la substitution initiale de la résine, en considérant tous les couplages peptiques comme quantitatif.

Ainsi, à la résine sèche **12a**, ont été ajoutés le cuivre et l'acide ascorbique, puis le L-Fucose propargylé et acétylé **23** dissout dans un mélange pyridine/NMP (3/7) et de DIEA pour obtenir le glycodendrimère de valence 9, **13a** (cf. Figure 101). La seringue réactionnelle a été mécaniquement agitée pendant 10h et le mélange initialement bleu devient rapidement marron, signe que le cuivre II a bien été réduit en cuivre I.

Le même processus a été appliqué à **17a** pour obtenir le glycodendrimère de valence 27, **18a** (cf. Figure 103 pour le glycodendrimère clivé et désacétylé correspondant **20a**).

Une fois la réaction finie, l'étape d'élimination du cuivre a été faite, la subsistance de cuivre pouvant entraîner des problèmes de toxicité *in vivo*, des gênes lors de la RMN et des études biologiques. Les lavages de la résine ont été faits avec du DMF, de l'acide ascorbique dissout dans un mélange DMF/pyridine (6/5) avant de passer aux lavages classiques¹⁷⁵. La résine passe d'une couleur verdâtre à jaune, marquant une amélioration du taux de cuivre sur la résine.

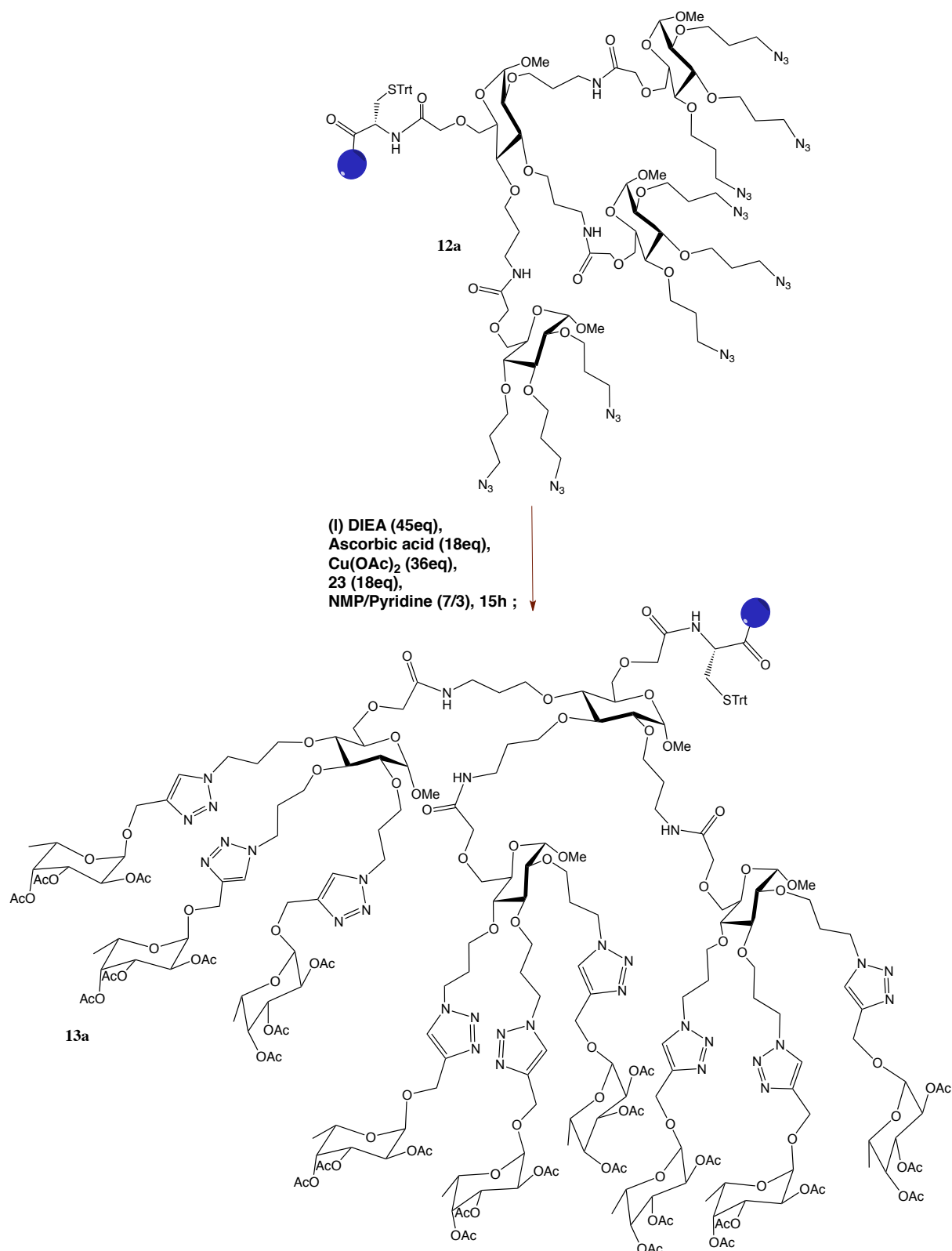


Figure 101 - Réaction de CuAAC sur 12a.

2. Clivage

Par mesure de précaution, pour éviter la déprotection du trityle, la réaction a été faite en plusieurs courtes expositions de trois minutes. Pour cela, le clivage se déroule dans la seringue.

Chaque réaction a été faite en deux étapes, tout d'abord le clivage avec une solution diluée de TFA à 0.8% dans du DCM puis, la neutralisation du mélange dans une solution de DIEA à 20% dans du DCM (cf. Figure 102). Lors du clivage, la résine se colore typiquement en rouge, temporairement ou pas¹⁸⁹.

La synthèse a été poursuivie après une simple évaporation des solvants.

3. Désacétylation

La désacétylation pour obtenir **15a** (cf. Figure 102), ou respectivement **20a** (cf. Figure 103), a été faite avec un protocole classique de méthanol dans de la soude. 10 équivalents de méthanol par fonction hydroxyle à déprotéger ont été utilisés. Malgré le bon fonctionnement de la réaction, d'importantes quantités de sels imposent une forte dilution lors de la purification par HPLC. Ainsi, le nombre d'injections et donc le temps de purification augmentent. Le plus gênant a été la diminution du signal d'absorption de l'HPLC qui complique grandement la purification qui l'était déjà de part la succession de multiples conjugaisons.

Par la suite un autre protocole réglant ce problème a été utilisé (cf. Figure 102): de la résine échangeuse d'ions de type amberlite IRA 400 OH⁻ à la place de la soude.

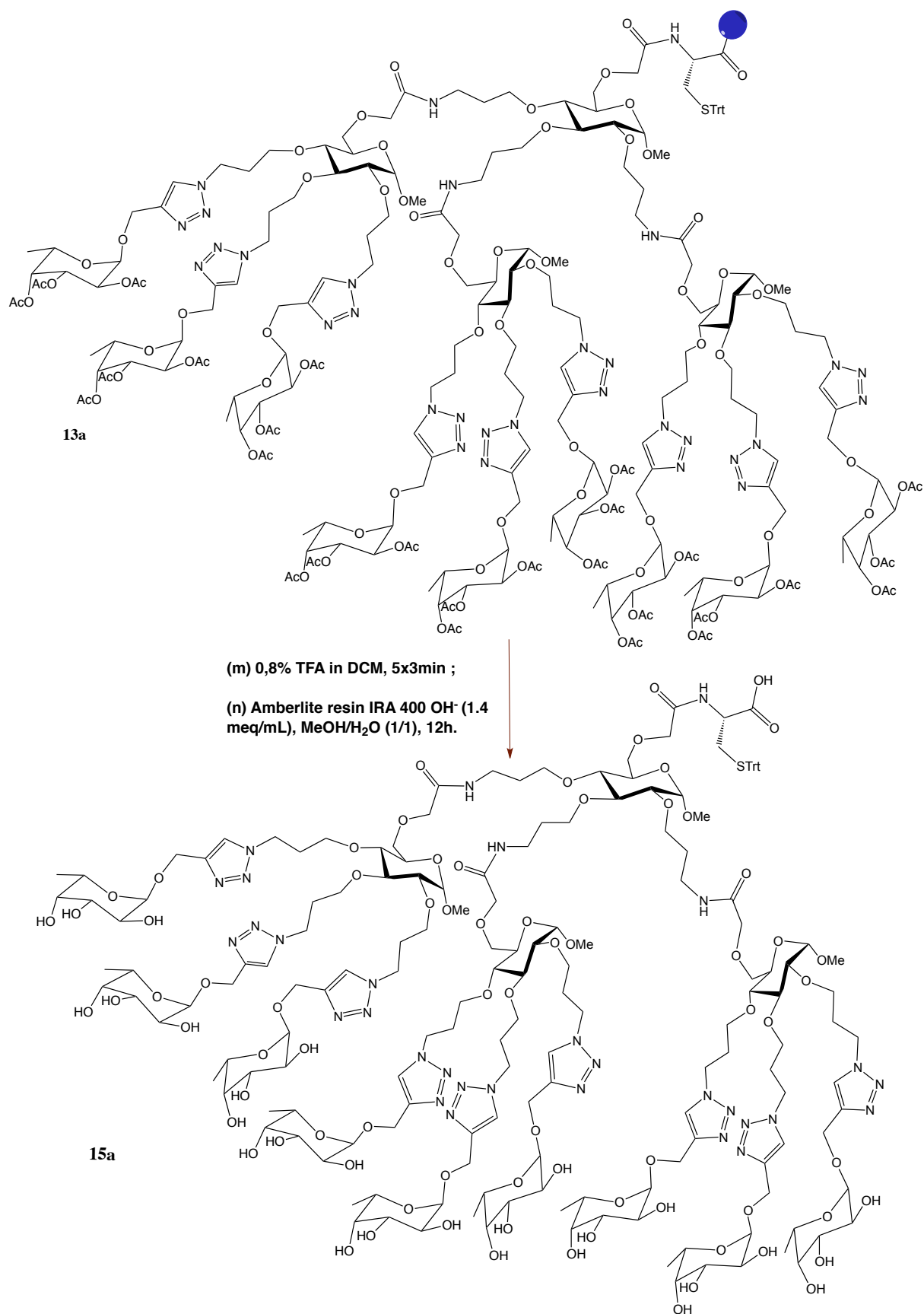


Figure 102 - Clivage et désacétylation de 13a.

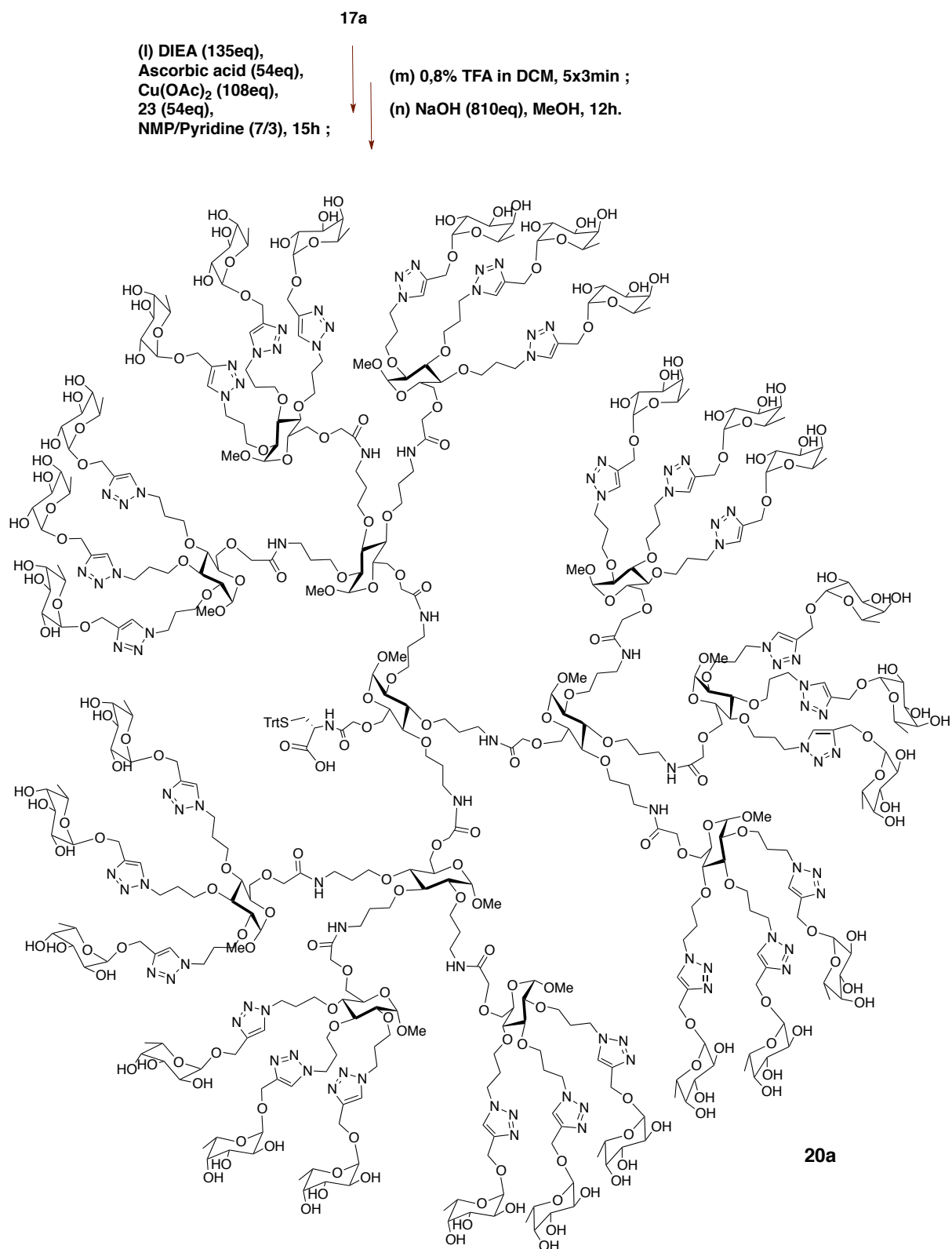


Figure 103 - Schéma de synthèse de 20a à partir de 17a.

III. Analyses

Il faut garder à l'esprit que lors d'une synthèse divergente, le dendrimère croît à partir d'un coeur, impliquant un nombre de fonctions augmentant exponentiellement avec le nombre de générations. Par conséquent, bien que chaque réaction soit sélective, le rendement est fortement touché à chaque génération. Si on prend l'exemple d'un dendrimère de type PPI de génération G_3 (cf. Figure 104), de valence 16, 56 réactions sont nécessaires à sa synthèse. Dans le cas avantageux de 99% de rendement pour chaque réaction, le rendement global ne sera que de $0.99^{56} \times 100$, c'est-à-dire 57%.

Chaque nouvelle génération est difficilement purifiée, ainsi la présence d'une petite quantité de dendrimère avec un défaut statistique ne peut être évitée et est amplifiée.

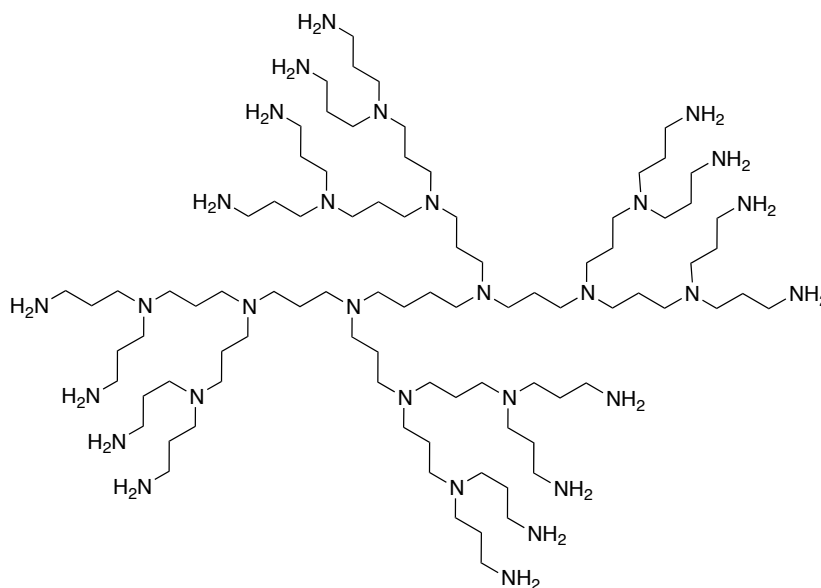


Figure 104 - dendrimère à base de PPI, de génération G_3 (valence 16).

La caractérisation des dendrimères est elle aussi compliquée de part leurs tailles, ou leurs asymétries. Plusieurs techniques de RMN (^1H , ^{13}C) ou de chromatographie (HPLC, ...) sont largement utilisées, mais elles ne permettent pas de révéler de petites quantités d'impuretés, tout particulièrement dans les générations importantes de dendrimères¹⁹⁰. Une analyse complémentaire avec de la spectroscopie de masse est nécessaire.

A. HPLC

Pour nos glycodendrimères, une analyse par HPLC analytique a d'abord été faite avec un gradient classique de 5 à 100% d'ACN dans de l'eau contenant du TFA à 0.1%.

L'analyse se repose sur l'absorbance de deux longueurs d'ondes, celle à 220nm pour les fonctions amides et celle à 280nm pour les cycles aromatiques du trityle. Ce dernier devait permettre de vérifier que le groupement trityle était bien resté sur le glycodendrimère. Cependant, il s'est trouvé très peu visible et ne n'a pas pu être exploité lors de la purification.

Le profil HPLC du brut pour le dendrimère basé sur l' α -D-glucopranoside de méthyle de valence 9, **15a**, est donné en Figure 105.A. et celui pour **20a** en Figure 106.A.. On remarque qu'en augmentant la génération du produit, un pic plus large a été observé, rendant plus compliqué la purification.

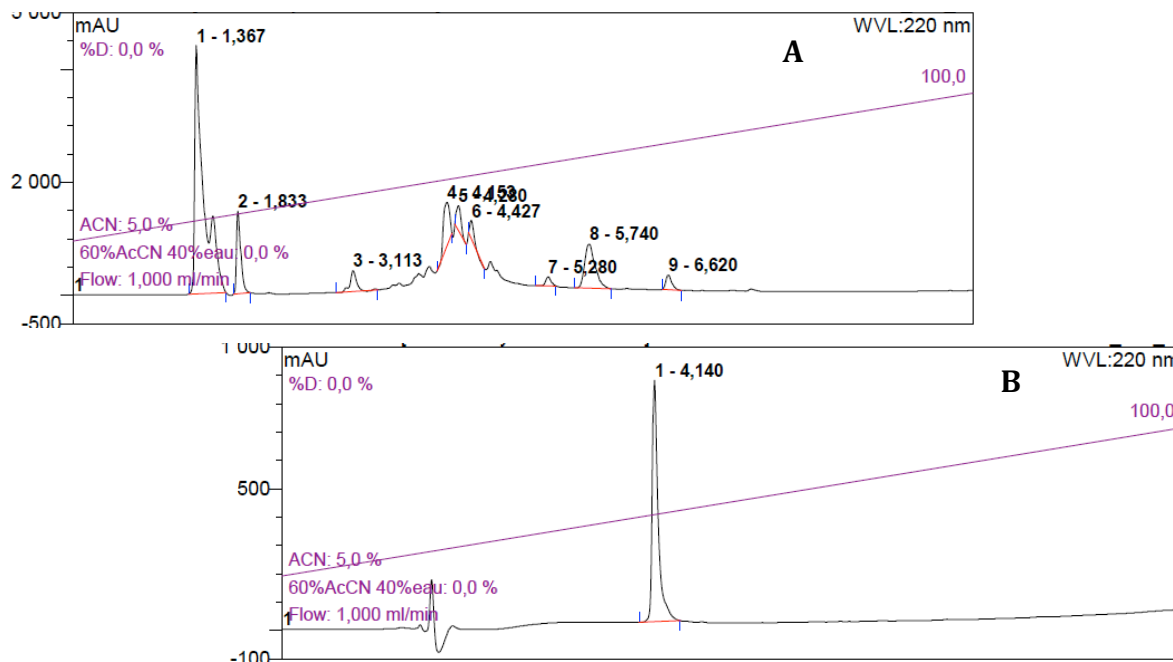


Figure 105 - Profil HPLC de **15a**, 5 à 100% d'ACN+0.1%TFA dans de l'eau à 0.1%TFA en 10min ; A. HPLC du brut ; B. HPLC après purification.

Lorsque les pics d'intérêts ont été repérés, le gradient a été modifié pour les avoir bien séparés et bien centrés sur le profil HPLC. La purification a alors été faite par une HPLC semi-préparative où toutes les fractions correspondantes aux pics ont été prises, analysées par MALDI puis lyophilisées en attendant les résultats pour faire une RMN du produit. Le profil HPLC du produit purifié **15a** est donné en Figure 105.B. et celui de **20a** en Figure 106.B..

Pour certains échantillons, une deuxième purification a été nécessaire entraînant une perte de produit non négligeable.

Un test au TCEP a été effectué par HPLC analytique pour vérifier qu'aucun pont disulfure n'existait entre deux dendrimères, ce qui pourrait arriver dans le cas où le groupement protecteur de la cystéine n'aurait pas résisté aux conditions de clivage.

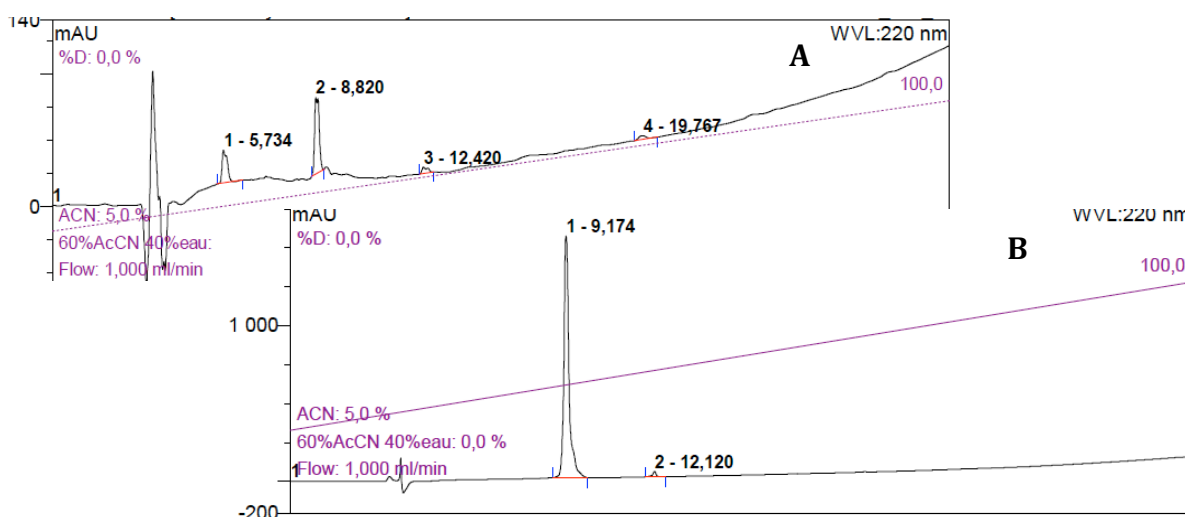


Figure 106 - Profil HPLC de 20a, 5 à 100% d'ACN+0.1%TFA dans de l'eau à 0.1%TFA en 30min ; A. HPLC du brut ; B. HPLC après purification.

Ces purifications ont été délicates et rejoignent le constat d'Hüttl et al. sur la purification de leurs dendrimères basés sur des lysines modifiées avec des alcynes (cf. page 123)¹⁸⁴. En effet, après trois couplages peptidiques de lysine (valence 16), seulement un cinquième du produit voulu avait été obtenu, représentant un rendement de 8,6% seulement. Dans notre cas, un rendement de 1.5% a été obtenu pour **15a** et de 1.3% pour **20a**.

B. RMN

Le motif fucosique a l'avantage d'avoir un groupement méthyle facilement repérable sur la RMN du proton donnant un doublet à 0.96ppm. Ce motif étant répété sur les glycodendrimères synthétisés **15a** et **20a**, il est d'autant plus visible. Il permet d'avoir une référence pour intégrer les autres protons du spectre et de vérifier qu'ils correspondent bien à ceux attendus. Ainsi, pour **15a**, la référence est mise à 27 protons et pour **20a**, à 81 protons.

Les pics à 7.94ppm, représentant les protons présents sur le triazole, et ceux à 4.85ppm, représentant les protons anomériques des fucoses ont bien l'intégration attendue respectivement de 9 protons pour le dendrimère de valence 9 (cf. Figure 107) et de 27 pour celui de valence 27 (cf. Figure 108).

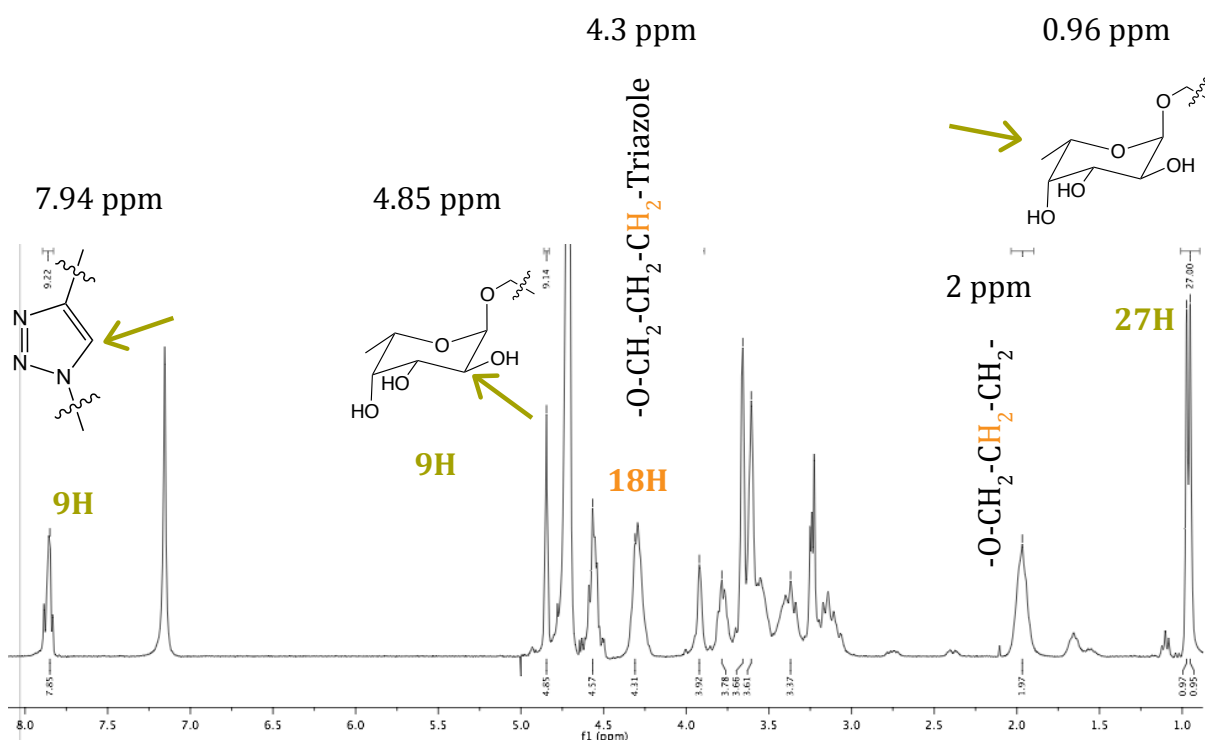


Figure 107 - Spectre RMN du proton de 15a.

Pour vérifier que les dendrimères ont bien toutes les branches voulues, on regarde certains pics caractéristiques de la structure interne de ceux-ci. Ces pics sont

assez confus et rassemblés dans un intervalle de ppm assez étroit. Cependant, on peut distinguer les pics isolés suivant : 4.3 ppm et 2 ppm.

Grâce à un COSY, on sait qu'ils sont voisins, ils font partis des espaceurs existant entre les générations. Vu le déblindage, celui de 2 ppm correspond à tous les $-O-CH_2-\underline{CH_2}-CH_2-$, c'est-à-dire ceux du bloc Elongateur et ceux du bloc Terminateur, étant tous deux similaires. Celui à 4.3 ppm, correspond donc aux protons $-O-CH_2-CH_2-\underline{CH_2}$ -Triazole, ainsi on a bien respectivement 18 protons pour le dendrimère de valence 9 et de 54 protons pour celui de valence 27.

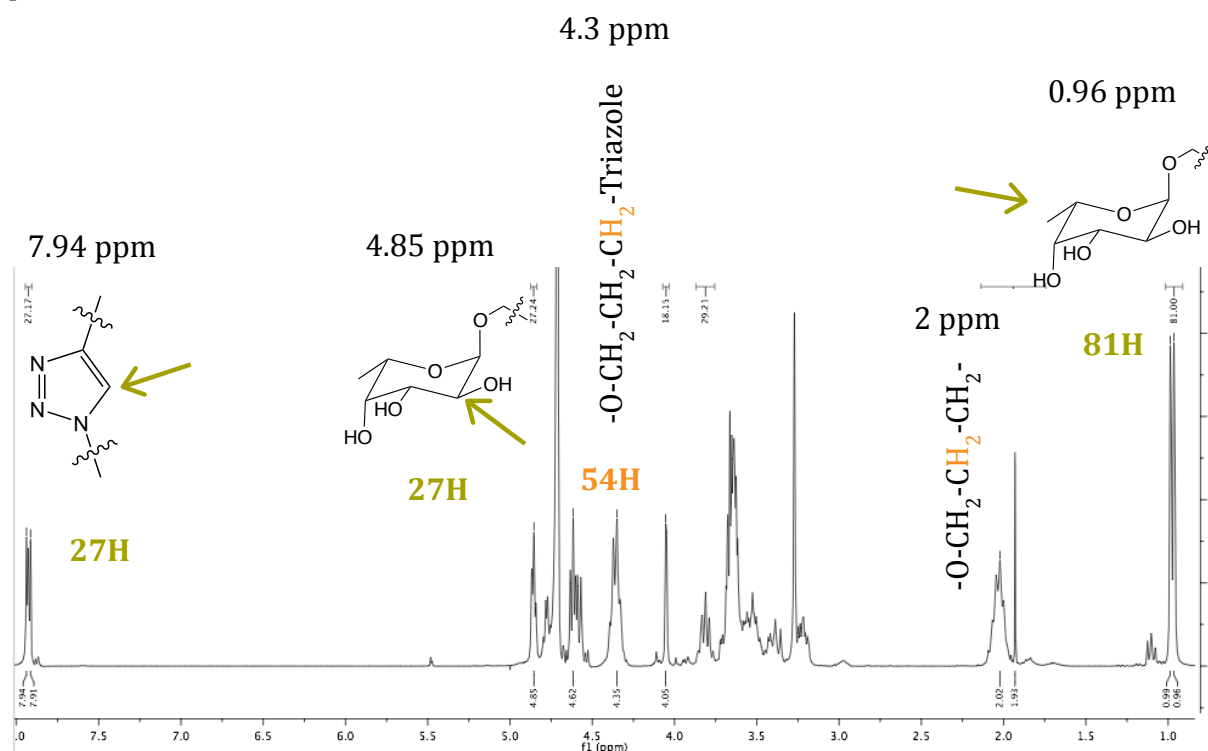


Figure 108 - Spectre RMN du proton de 20a.

La RMN du proton permet de vérifier qu'aucun fucose ou coeur α -D-glucopyranoside n'a subi d'anomérisation. En effet, en calculant les constantes de couplages des protons anomériques, il est facile de remonter à la nature de l'anomère : celles des anomères alpha sont inférieures à 5Hz tandis que celles des anomères bêta avoisinent les 8-10Hz.

A partir des analyses RMN, les protons anomériques des fucoses sortent quasiment au même endroit et ont une constante de couplage inférieure à 5Hz, ce qui est en accord avec la configuration α attendue. Les protons anomériques des métyles α -D-

glucopyranosides sortent malheureusement en même temps qu'un autre pic et ne peuvent être analysés.

C. Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation (MALDI)

Le MALDI a prouvé être une méthode analytique directe de spectroscopie de masse adapté à une utilisation en routine pour les dendrimères¹⁹¹. Elle ne requiert que de très faibles quantités de produit, de l'ordre de la picomole, et, du fait qu'il s'agit d'une technique d'ionisation douce, elle ne provoque que très peu de fragmentations, facilitant l'interprétation des spectres et de la pureté des dendrimères. Cette méthode se différencie de l'ionisation par électrospray (ESI) par la création de peu d'ions multichargés, et par une ionisation plus facile des masses importantes, facilitant ces deux derniers aspects.

Deux modes existent, le mode linéaire et le mode réflector. Ce dernier est caractérisé par un allongement du temps de vol, ce qui permet une meilleure résolution, néanmoins il ne peut être utilisé que pour des masses inférieures à 5000 g/mol. Dans notre cas, il ne permettait pas d'exploiter le spectre, le mode linéaire a donc été utilisé.

La molécule à analyser est cristallisée avec une matrice qui va absorber l'énergie du laser, s'exciter et désorber le produit à analyser. Parmi le choix possible, l'acide 2,5-dihydroxybenzoïque (DHB), représentée en Figure 109, a été choisi du fait qu'il a été remarqué comme adaptée aux oligosaccharides.

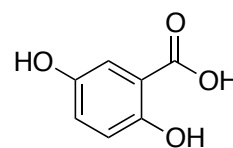


Figure 109 - DHB.

Un spectre MALDI très net a pu être obtenu pour le dendrimère issu de l' α -D-glucopyranoside de méthyle de génération G₁. Il a bien donné les résultats attendus avec une masse molaire de 4035.89 g/mol (cf. Figure 110.A. pour le spectre théorique et Figure 110.B. pour le spectre expérimental).

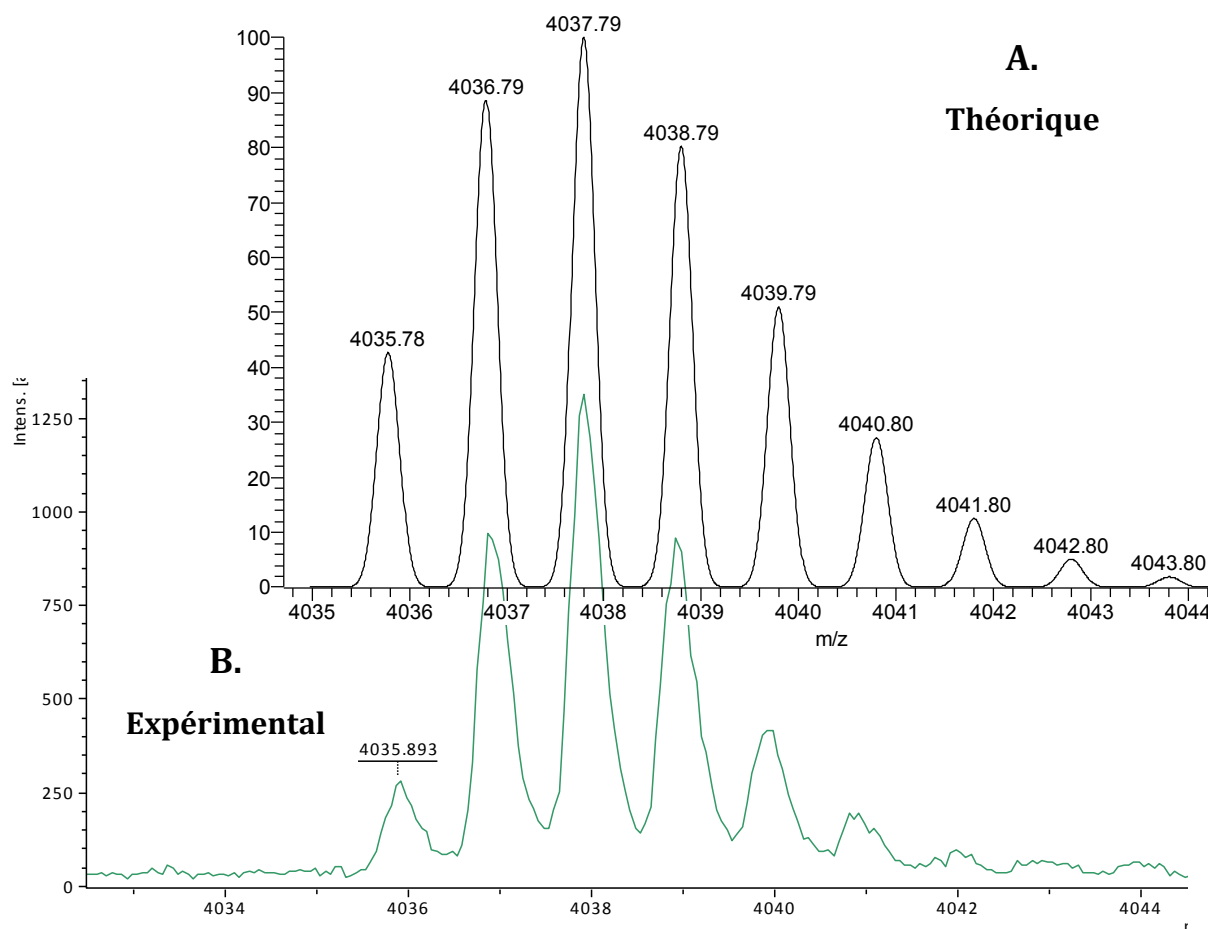


Figure 110 - Spectre MALDI de 15a (A. spectre théorique et B. spectre expérimental).

Lorsque la génération augmente, les dendrimères volent avec plus de difficultés dans le MALDI-TOF et une puissance de laser plus importante doit être appliquée. Par conséquent, la qualité de la ligne de base est dégradée, des pics plus larges et quelques fragmentations peuvent apparaître. Ainsi, pour l'analyse de la génération suivante G_2 , la masse importante très importante (11789.36 g/mol), et n'a pas pu être obtenue avec une bonne résolution.

D'autres études sur des glycodendrimères ont été confrontées à ce même problème dont celle de Fernandez-Megia et al.^{192, 193}. En effet, sur le spectre MALDI-TOF de son dendrimère de génération G_2 , de valence 27 (la génération G_1 sans la CuAAC des fucoses est représenté en Figure 112) un massif est présent au lieu d'un pic bien défini (cf. Figure 111).

Il est bon de noter que les glycodendrimères de hautes masses molaires peuvent se cliver à cause de la puissance du laser et produire des fragments pouvant être faussement interprétés comme résultant d'une réaction incomplète.

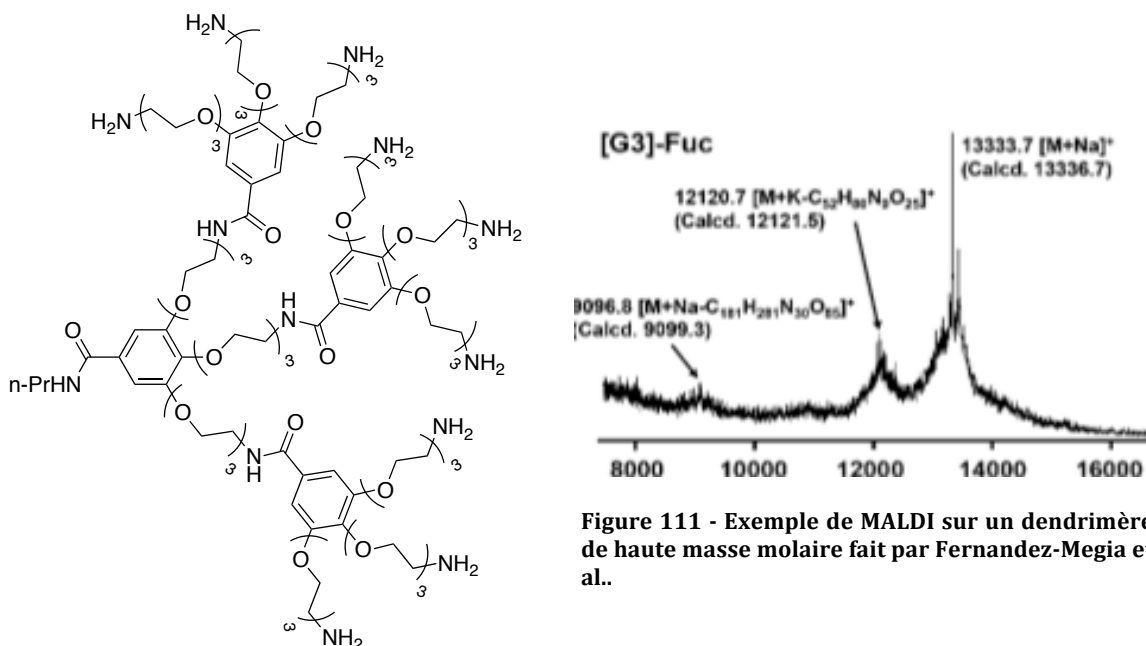


Figure 111 - Exemple de MALDI sur un dendrimère de haute masse molaire fait par Fernandez-Megia et al..

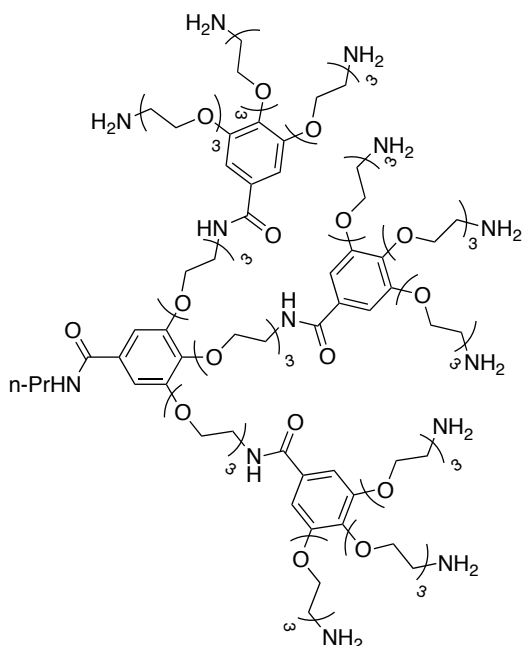


Figure 112 - Dendrimère de génération G_1 synthétisé par Fernandez-Megia et al..

IV. Changements de stratégie de synthèse

A. Réduction des azotures en amines sur support solide

En vue d'optimiser la synthèse, il serait judicieux d'arrêter celle des blocs au produit azoturé et de réduire directement les azotures en amines sur le support solide. Cela éviterait l'étape de réduction des azotures et de protection des amines, difficile à procéder et purifier convenablement à grosse échelle.

Plusieurs méthodes sont possibles, l'utilisation :

- d'agents réducteurs comme $\text{NaBH}_4/\text{LiAlH}_4/\text{H}_2$,
- de phosphines, ou
- de thiols.

Les agents réducteurs comme LiAlH_4 ne sont soit pas assez sélectifs aux azotures et vont attaquer les fonctions amides qui structurent le dendrimère et rallient le support solide au dendrimère (cf. les liaisons rouges sur la Figure 113), soit nécessitent un catalyseur solide qui incompatible avec un support solide. De ce fait, on ne considèrera pas cette possibilité de réduction.

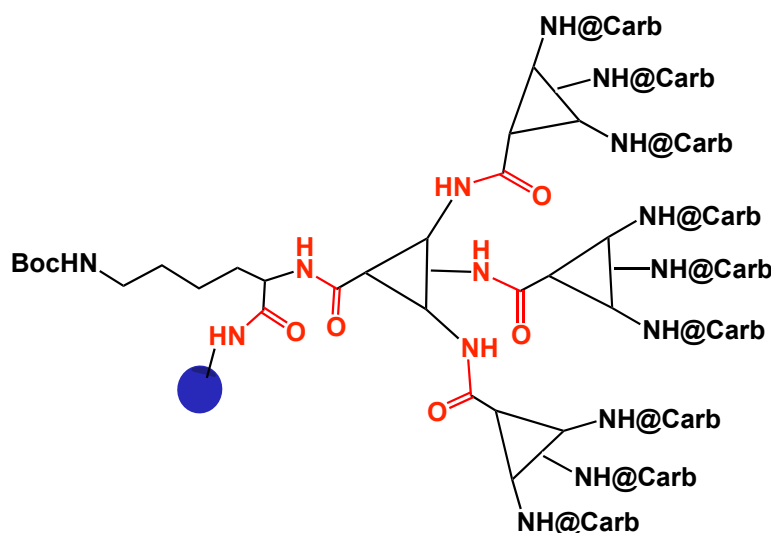


Figure 113 - Structure schématisée d'un dendrimère de génération 1.
En rouge les liaisons amides sensibles aux réductions.

1. Les phosphines

La réduction par phosphine est appelée communément la réaction de Staudinger. La nature des phosphines est assez variée ($P(\text{Bu})_3$, $P(\text{Ph})_3$, ...). C'est une méthode douce composée de deux étapes (cf. Figure 114) : l'addition de phosphine sur l'azoture qui après réarrangement formera l'iminophosphorane et l'hydrolyse de cette dernière pour former l'amine voulue. Le principal inconvénient de cette méthode est la formation d'oxyde de phosphine, assez difficile à éliminer.

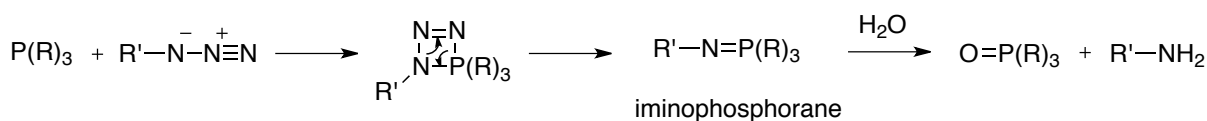


Figure 114 - Réaction de Staudinger.

Pour le support solide, l'hydrolyse est plus gênante que l'oxyde de phosphine. En effet, l'eau peut contracter le polymère constituant la résine et rendre moins voire pas réactives les fonctions positionnées dessus. Bräse et al.¹⁹⁴ ont confirmé cet effet grâce aux réactions de Staudinger classiques (cf. entrée 1 du Tableau 8) effectuées sur des fragments hydrophiles et des fragments plus hydrophobes attachés à une résine de type Rink (cf. respectivement Figure 115.A. et Figure 115.B.). Ils ont remarqué une différence de réactivité entre les deux, les amenant à essayer différentes conditions de réactions pour les fragments ne donnant pas le produit voulu, c'est-à-dire les plus hydrophobes.

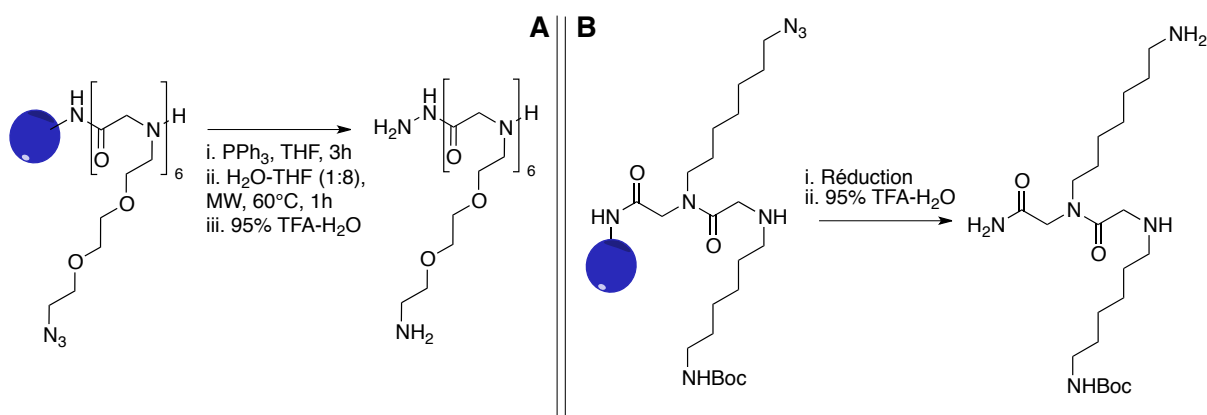


Figure 115 - A. Exemple de synthèse d'un aminopeptide fonctionnalisé sur une résine de type Rink amide par Bräse et al. ; B. Réduction de l' ω -azidopeptide utilisé pour le screening décrit dans le Tableau 8 sur une résine de type Rink amide par Bräse et al..

Entrée	Conditions de la réaction en Figure 115.B	Température (°C)	Temps de réaction (h)
1	a) P(Bu) ₃ , THF	r.t.	3
	b) H ₂ O:THF (1 :8)	r.t.	0.5
2	a) P(Bu) ₃ , THF	r.t.	3
	b) H ₂ O:THF (1 :8), MW	60°C	0.5
3	a) P(Ph) ₃ , THF	r.t.	3
	b) H ₂ O:THF (1 :8)	r.t.	0.5
4	a) P(Ph) ₃ , THF	r.t.	3
	b) H ₂ O:THF (1 :8), MW	60°C	0.5
5	a) P(Bu) ₃ , THF	r.t.	4
	b) H ₂ O:THF (1 :8)	r.t.	12
6	a) P(Bu) ₃ , THF	r.t.	4
	b) H ₂ O:THF (1 :8), MW	60°C	1
7	a) P(Bu) ₃ , THF	r.t.	4
	b) H ₂ O:DMF (1 :4)	r.t.	12
8	a) P(Bu) ₃ , THF	r.t.	4
	b) H ₂ O:DMF (1 :4), MW	60°C	1
9	a) P(Bu) ₃ , THF	r.t.	4
	b) NH ₄ OH concentré:DMF (1 :4)	r.t.	12
10	a) P(Bu) ₃ , THF	r.t.	4
	b) H ₂ O:AcOH :DMF (1:2 8), MW	60°C	1

Tableau 8 - Liste de conditions de réductions essayées sur des Résines Rink amide par Bräse et al. ; aucun ou très peu de produit détecté par MALDI-TOF.

Parmi les essais effectués et récapitulés dans le Tableau 8, on trouve des mélanges de solvants diminuant la quantité d'eau (cf. entrée 5 vs. 7), des temps d'hydrolyse plus ou moins long et l'utilisation d'un micro-onde (cf. entrées paires). Les réactions, suivies par MALDI-TOF, n'ont pas donné le produit escompté mais seulement du réactif de départ et l'intermédiaire iminophosphorane. Cette méthode de réduction n'a donc pas été retenue par la suite.

2. Les thiols

Le plus commun des agents réducteurs thiolés est le 1,3-propanedithiol, utilisé depuis 1978 grâce à Bayley et al. (cf. Figure 116). De multiples structures ont été testées et ont démontré sa sélectivité envers les azotures¹⁹⁵.

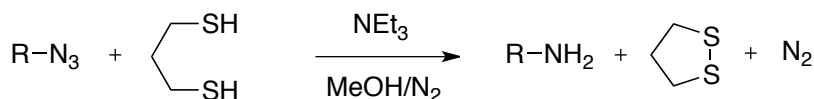


Figure 116 - Réaction de réduction avec du 1,3-propanedithiol par Bayley et al..

Le temps de réaction est assez variable, il peut aller de 1 minute à 120h pour des conditions et un nombre d'azotures à réduire similaires. Cette réaction se fait habituellement dans du méthanol mais des solvants plus adaptés au support solide, comme le DMF, peuvent être utilisés moyennant un temps de réaction plus long. Cette réaction est stoechiométrique mais des excès de dithiol et de triéthylamine sont généralement appliqués (souvent 5eq de chaque pour une fonction azoture à réduire et une concentration de méthanol de 0.2M).

Quelques exemples ont été effectués sur support solide avec, par exemple, Toth et al.¹⁹⁶. Ils ont réduit l'azoture placé en position anomérique d'un dérivé d'acide glucuronique supporté sur une résine de type 2-chlorotrityle, et ont adapté le protocole avec succès, en omettant le solvant et en multipliant par 5 les équivalents usuels en synthèse homogène (25eq de NEt₃ et de dithiol par azoture) (cf. Figure 117). Cette technique a l'avantage de nécessiter seulement un lavage au DMF et un test Kaiser/ATR-FTIR pour passer au couplage peptidique suivant.

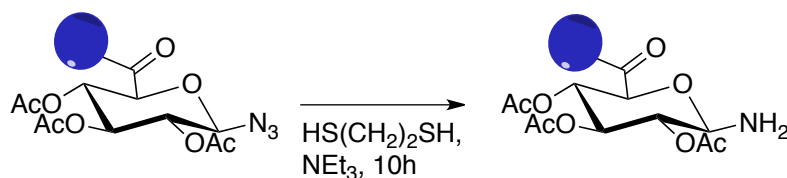


Figure 117 - Réduction faite par Toth et al..

Bräse et al. ont remarqué que les thiols jouaient un rôle prépondérant dans la réduction des azotures sur une résine de type Rink lors de l'utilisation de chlorure d'étain¹⁹⁴. En effet, leurs essais montrent que le chlorure d'étain ne peut seul avoir une conversion totale du réactif satisfaisante (cf. entrée 1 et 2 vs. 3 et 4 du Tableau 9). De précédentes études ont confirmé que les deux couples de réactifs, PhSH/NEt₃ et SnCl₂/NEt₃, mettaient plusieurs heures à finir la réduction d'azoture là où le mélange Sn(II)/PhSH/NEt₃ met seulement 2-3 minutes¹⁹⁷. Le fort pouvoir réducteur de Sn(II)/PhSH/NEt₃ ne peut donc pas être attribué par la seule présence de ces deux couples de réactifs dans le milieu.

Entrée	Conditions de la réaction en Figure 115.B	Température (°C)	Temps de réaction (h)	Remarque
1	1M SnCl ₂ in DMF, MW	60°C	1	B
2	1M SnCl ₂ in DMF	r.t.	12	B
3	0.1M SnCl ₂ , 0.4M PhSH, 0.5M NEt ₃ in THF	r.t.	1	C
4	0.1M SnCl ₂ , 0.4M PhSH, 0.5M NEt ₃ in THF, MW	60°C	1	C

Tableau 9 - Différentes conditions de réaction de réduction d'un azoture en amine sur une résine de type Rink amide par Bräse et al. ; B= Produit visible en MALDI-TOF mais réactif de départ fortement détecté, C= Quantitative conversion vu en MALDI-TOF.

Bartra et al. ont alors proposé un mécanisme¹⁹⁷, montré sur la Figure 118, en prenant pour exemple $\text{Sn}(\text{Ph})_2$. Ils ont trouvé que ce dernier, en présence de PhSH et d'une base, est en équilibre rapide avec $\text{BH}^+ [\text{Sn}(\text{SPh})_3]^-$. Cet intermédiaire va s'additionner sur l'azoture puis donner l'espèce $\text{R-NHSn}(\text{SPh})_3$ grâce à un réarrangement. S'ensuit un clivage pour donner l'amine et $\text{Sn}(\text{SPh})_4$.

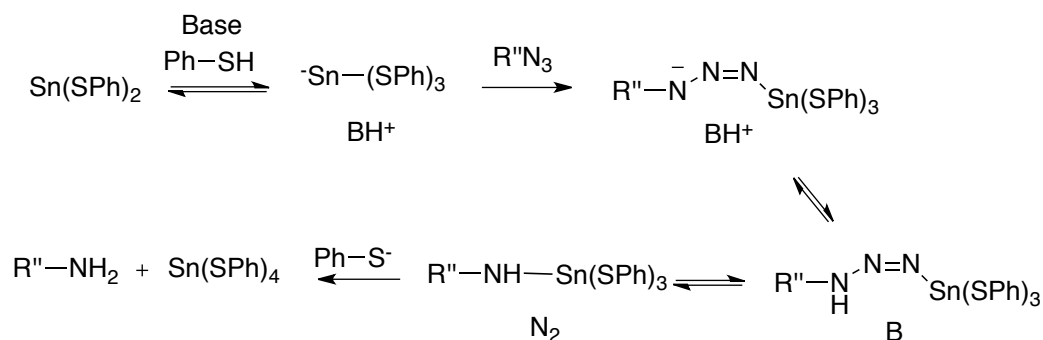


Figure 118 - Mécanisme de réduction d'un azoture en amine proposé par Bartra et al..

Différentes conditions utilisant cette association $\text{Sn}(\text{II})/\text{thiol}/\text{Base}$ ont été essayées par Bartra et al., quelques unes ont été mises dans le Tableau 10¹⁹⁷. Plusieurs leçons peuvent en être tirées:

- un vaste choix de thiols peut être utilisé (thiophénol, 1,3-propanedithiol, ...),
- le solvant utilisé lors de la réaction influe sur le rendement comme suit : ACN ou $\text{Acétone} > \text{THF} > \text{Acétone}/\text{H}_2\text{O} > \text{pyridine} > \text{DMF} > \text{MeOH} > \text{THF}/\text{H}_2\text{O}$
L'utilisation du support solide est ainsi possible.
- la base utilisée (NEt_3 , la 4-diméthylaminopyridine (DMAP), NH_4Et , ...) importe peu excepté la pyridine qui fait chuter le rendement.
- le ratio $1x\text{SnCl}_2/4x\text{PhSH}/3x\text{NEt}_3$ a été trouvé le plus efficace.

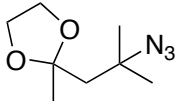
Conditions utilisées pour réduire	% d'azoture réduit	Temps de réaction
		
Sn(II)/HS(CH ₂) _n SH/NEt ₃ /CH ₃ CN n=2 ou 3	100	2min
Sn(II)/PhCH ₂ SH/NEt ₃ /CH ₃ CN	"	10min
Sn(II)/PhSH/NEt ₃ /CH ₃ CN	"	20min
Sn(II)/HStBu/NEt ₃ /CH ₃ CN	"	45min
H ₂ /Pd-C/MeOH	"	2h15
LiAlH ₄ /Et ₂ O	"	6h
Sn(II)/py-2-SH/NEt ₃ /CH ₃ CN	85%	12h

Tableau 10 - Différentes conditions de réduction rassemblées par Bartra et al..

B. Nouvelle synthèse

Lors de l'application de la stratégie de synthèse aux blocs issus du pentaérythritol, le profil HPLC du glycodendrimère portant 9 fucoses montrait une complexité qui malgré de multiples gradients HPLC, n'a pas pu être surmonté. Au vu des problèmes de non-reproductibilité des résultats, un changement de stratégie a été enclenché.

1. Changement de la résine et du premier acide aminé

Le premier changement a été fait sur la résine, celle-ci a été changée par de la résine de type Rink amide (cf. Figure 119).

Cette résine ne dispose pas de conditions de clivage permettant de garder le trityle de la cystéine contrairement à la 2-chlorotrityle, ainsi il faudrait re-protéger cet acide aminé après clivage pour éviter la formation de ponts disulfures entre deux dendrimères. Pour éviter cette étape supplémentaire et une perte de produit, une amine

non protégée pourrait servir de fonction disponible pour une fonctionnalisation future du dendrimère. De ce fait, la cystéine est remplacée par une lysine (cf. Figure 120) portant deux amines, l'une protégée avec un groupement Fmoc et l'autre avec un groupement Boc. Celui-ci ne tiendra pas aux conditions de clivage de la résine de type Rink amide et permettra une future fonctionnalisation du glycodendrimère.

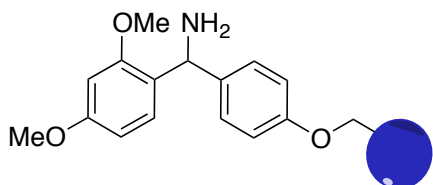


Figure 119 - Résine de type Rink amide.

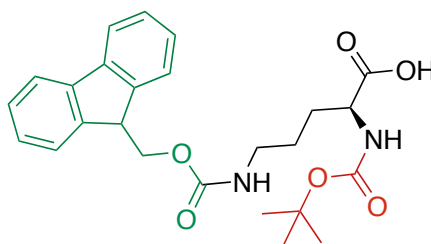


Figure 120 - BocLys(Fmoc).

La préparation de cette résine diffère légèrement de celle de type 2-chlorotrityle (cf. Figure 121). La résine est tout d'abord allongée dans du DCM. Sur ce genre de résine les amines sont déjà protégées, il faut donc tout d'abord les déprotéger grâce à un mélange pipéridine/DMF (2/8) avant de mettre le premier acide aminé via un couplage classique HBTU/HOBt.

Le loading de la résine est réduit à 0.2 mmol/g, comme pour les essais précédents. Une protection des amines restantes sur la résine est ensuite faite par des acétates grâce à de l'anhydride acétique et du DIEA.

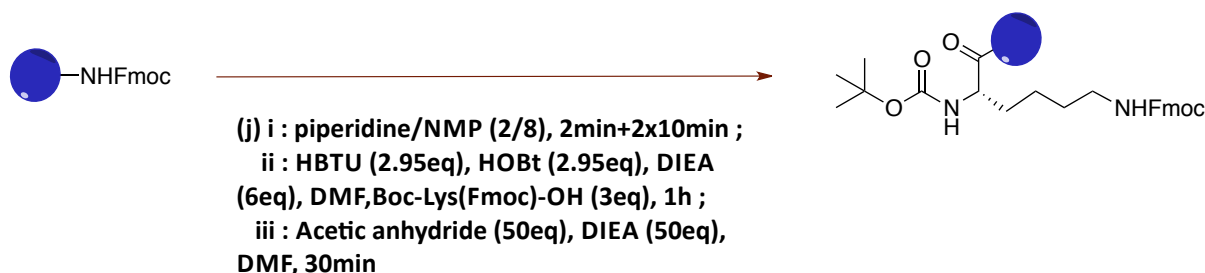


Figure 121 - Préparation de la résine et premier couplage peptidique

2. Changement de la synthèse des générations

La mise au point de la synthèse des glycodendrimères demande énormément de quantités de blocs Elongateur et Termineur. La synthèse de celui dit Elongateur n'est pourtant pas très efficace et pose des problèmes d'approvisionnement. De ce fait, une autre stratégie de synthèse a été envisagée : la réduction sur support solide des azotures du bloc Termineur en amines. Cela permettrait d'avoir directement le bloc Elongateur avec les amines déprotégés, prêt pour le couplage peptidique suivant, évitant les problèmes de purification de ce bloc.

D'après la littérature, le choix du réducteur s'est tourné vers le 1,3-propanedithiol.

L'essai a été fait sur le bloc issu du pentaérythritol en vue d'un glycodendrimère de valence 9. La réaction a été faite sur 250mg de résine pour être à une quantité de mole de réaction à 0.05mmol, comparable aux exemples précédents.

Les amines portant les groupements Fmoc de la résine préparée sont déprotégées (cf. Figure 122). Le premier couplage peptidique a été ensuite fait en pré-activant le bloc Termineur **8b** avec les agents de couplages classiques HBTU/HOBt dans du DIEA et du DMF pour donner **11b**.

Après un test de Kaiser négatif, la réduction est lancée avec le mélange 1,3-propanedithiol/triéthylamine pour donner **11'b**.

Après 12h de réaction, un test de Kaiser vérificatif a été fait avant de lancer le couplage peptidique suivant en pré-activant le bloc Termineur, **8b**, dans les mêmes conditions qu'auparavant pour donner **12b**.

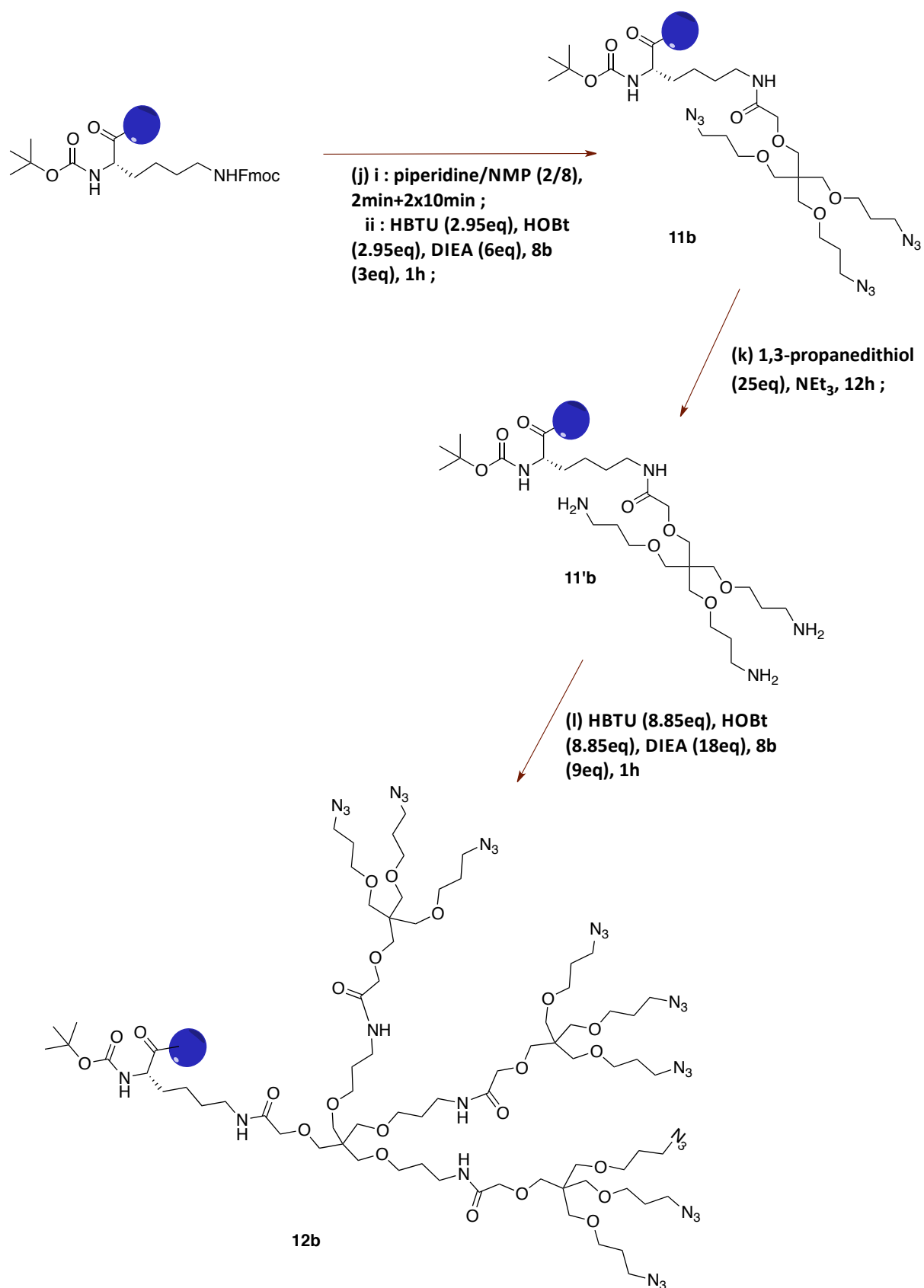


Figure 122 - Schéma de synthèse de 12b.

La réaction de CuAAC a été lancée dans les mêmes conditions de réaction que l'exemple issu de l' α -D-glucopyrannoside de méthyle, du $\text{Cu}(\text{OAc})_2$, de l'acide ascorbique, du DIEA dans du DMF/pyridine (7/3), excepté le L-fucose propargylé qui est cette fois-ci non acétylé **24**.

La réaction est suivie directement sur le support solide par ATR-FTIR (*Attenuated Total Reflection- Fourier transform infrared spectroscopy*)^{198, 199, 200}. La méthode est basée sur la diminution de la bande d'absorption relative à l'azoture à 2100cm^{-1} . Après 12h de réaction, la bande azoture disparaît, la réaction est finie (cf. Figure 123).

Les lavages classiques ont été complétés par un supplémentaire composé d'un mélange d'acide ascorbique solubilisé dans un mélange DMF/pyridine (6/5) pour enlever les dernières traces de cuivre.

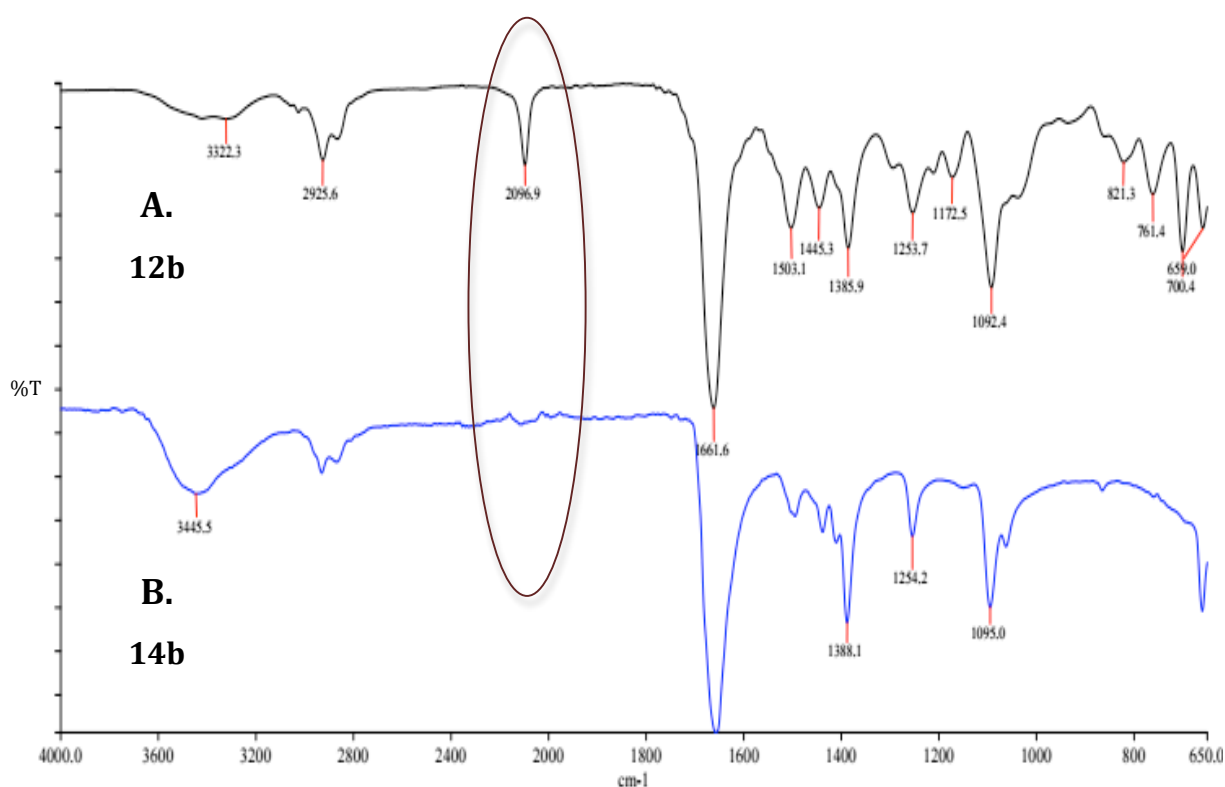


Figure 123 - Spectres ATR-IR de 12b en A et 14b en B.

La résine a été clivée avec un mélange TFA/H₂O/TIS (95/2.5/2.5) (cf. Figure 126). Après lyophilisation, un reste de cuivre subsiste, confirmé par une analyse MALDI.

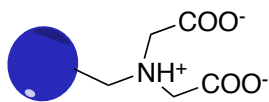


Figure 124 - Chelex.

Pour enlever les dernières traces de celui-ci, le produit a été mélangé à une résine échangeuse d'ion appelée Chelex^{201, 202, 203}. Elle est composée d'un copolymère de styrène et de divinylbenzène portant des groupements iminodiacétate qui chélatent le cuivre présent en solution (cf. Figure 124).

Pour éviter ces étapes, les prochains lavages seront faits avec une solution de DIEA et de diéthylthiocarbamate dans du DMF suivis des lavages classiques avec du DMF^{204, 205}.

En reprenant le système vu pour la RMN des dendrimères précédents, le doublet à 1.01ppm, représentant les méthyles du fucose, sert de référence pour l'intégration des protons du spectre. Elle est mise à 27 protons.

Les pics à 7.97ppm, représentant les protons présents sur le triazole, et à 4.91ppm, représentant les protons anomériques des fucoses ont bien l'intégration attendue de 9 protons (cf. Figure 125).

Lorsqu'on regarde la structure interne du dendrimère, les pics vers 2.2ppm sont isolés, ils correspondent à tous les -O-CH₂-CH₂-CH₂-, c'est-à-dire ceux du bloc Elongateur (6 protons) et ceux du bloc Termineuse (18 protons), soit un total de 24 protons. Ce qui correspond avec l'intégration eue par la référence. Néanmoins, la RMN laisse une incertitude non négligeable et ne peut constituer la seule preuve. Des analyses supplémentaires doivent être faites comme un MALDI.

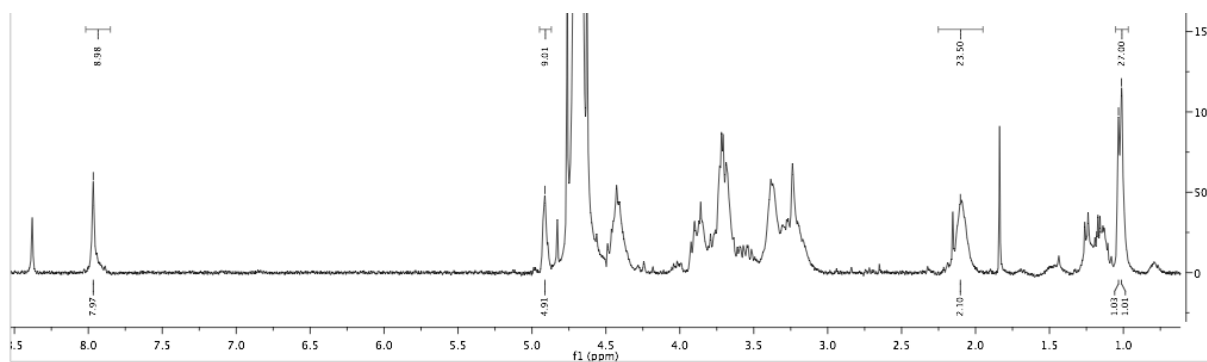


Figure 125 - Spectre RMN du proton de 15b.

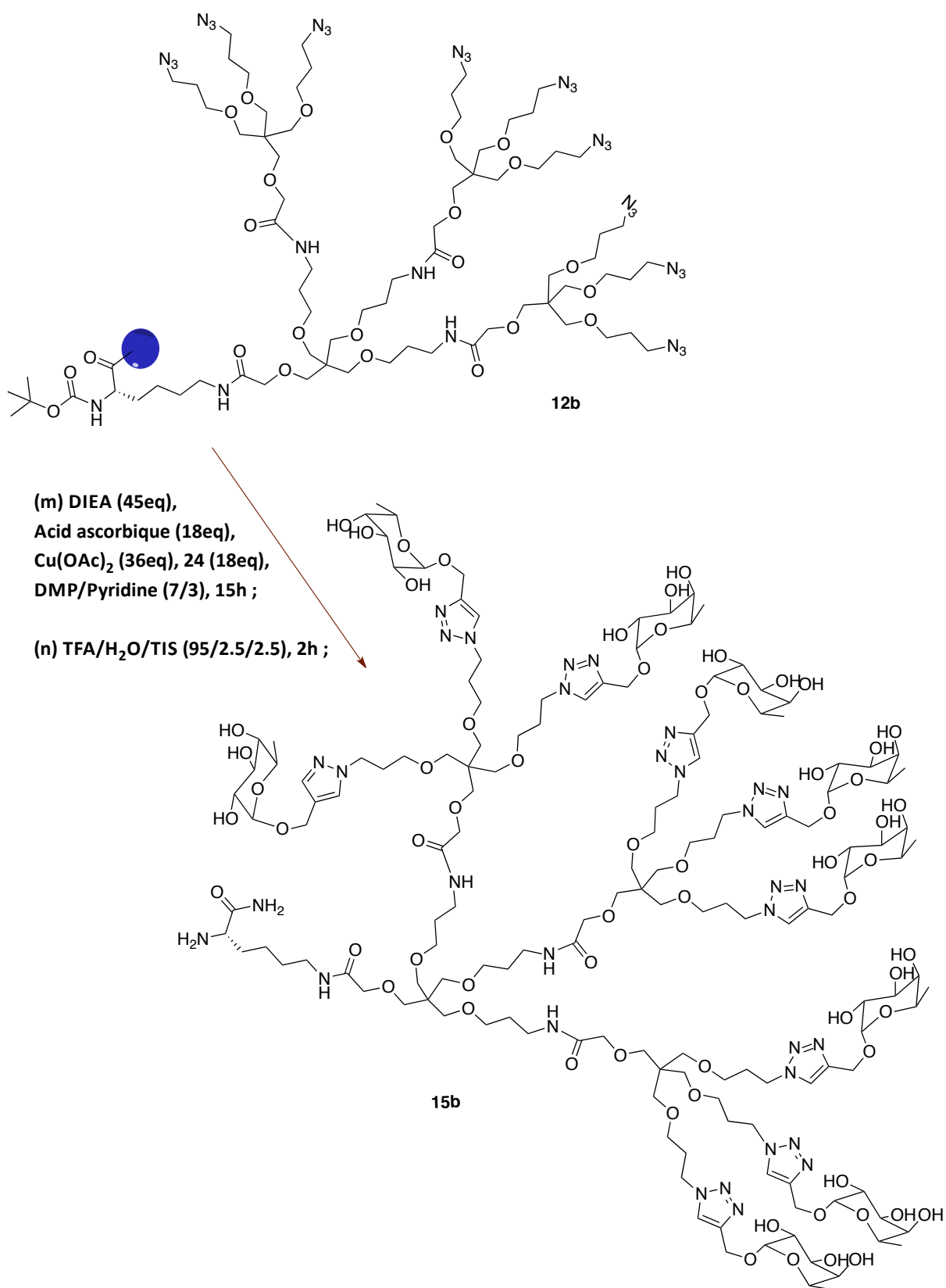


Figure 126 - Réaction de CuAAC et Clivage de 12b.

V. Conclusion

La stratégie de synthèse sur support solide a été testée sur les blocs synthétisés dans le chapitre précédent, plus précisément sur ceux issus de l'alpha D-glucopyranoside de méthyle. Deux glycodendrimères ont ainsi été synthétisés, un comportant 9 fucoses, **15a**, et un autre en comportant 27, **20a**. Les problèmes de purification et de caractérisation survenus ont été surmontés pour le glycodendrimère de valence 9. La caractérisation par masse reste difficile pour celui de valence 27 d'où la focalisation du développement des glycodendrimères de valence 9.

Des changements de stratégie de synthèse ont été testés sur un des blocs issu du pentaérythritol en vue d'améliorer son efficacité et optimiser les blocs nécessaires. En effet, cette nouvelle stratégie permet de s'affranchir de la synthèse peu efficace du bloc Elongateur. Ainsi, la réduction sur support solide des azotures du bloc Terminateur suffit à la synthèse des générations du dendrimère. Néanmoins, des tests supplémentaires restent à effectuer.

Chapitre III.

Etudes biologiques

Les interactions biologiques entre DC-SIGN et les glycodendrimères synthétisés sont analysées grâce à une technique de Biacore® par l'équipe de M. Fieschi à l'institut de biologie structurale de Grenoble.

L'étude des glycodendrimères **15a** et **20a** est en cours. Cependant, une idée de l'ordre de grandeur des IC_{50} a pu être obtenue grâce à des glycodendrimères proches de ceux synthétisés. Un effet multivalent ainsi qu'une diminution importante, jusqu'à 1000 fois l' IC_{50} de l'entité mosaccharidique, le mannose, ont été remarqués.

I. Principe du Biacore®

A. Généralités

Le Biacore® est le nom commercial d'un appareil qui se repose sur la technique de SPR (*Surface Plasmon Resonance*). Il permet d'analyser en temps réel l'interaction entre deux molécules.

L'appareil est composé d'un film conducteur d'or fonctionnalisé posé entre un prisme ayant un haut indice réfractif et un milieu externe diélectrique de faible indice réfractif (milieu biologique par exemple) (cf. Figure 127). Cette différence d'indice ainsi qu'un certain angle d'incidence va faire réfléchir intégralement le faisceau de lumière incidente polarisée.

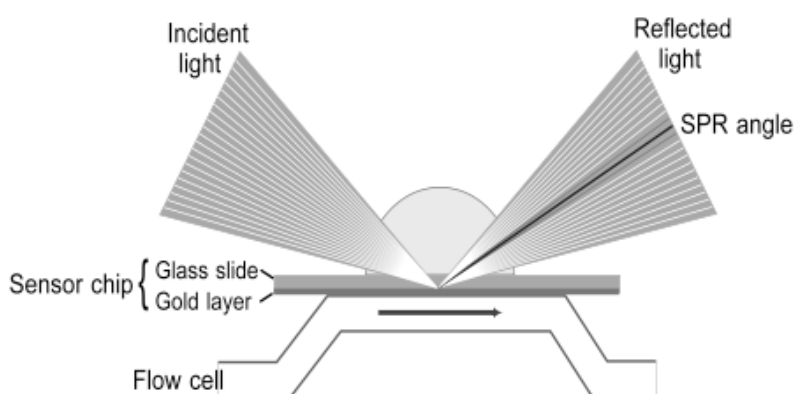


Figure 127 - Représentation de l'appareil Biacore®.

Les électrons libres conducteurs du film d'or forment des oscillations périodiques appelées ondes plasma. Comme toutes les ondes périodiques électromagnétiques, on peut aussi les décrire en terme de particules. De même qu'un photon est le nom particulier d'une onde lumineuse, un plasmon est celui d'une onde plasma.

Les plasmons confinés à la surface du métal, les plasmons de surface, créent un champ électrique, appelé onde évanescente, situé perpendiculairement à l'interface et qui s'étend au prisme et au milieu extérieur.

A certains angles d'incidence, l'onde lumineuse incidente entre en résonance avec les nuages électroniques du métal. Par conséquent, des photons vont être convertis en plasmons, ce qui fera diminuer l'intensité du faisceau réfléchi. On appelle ce phénomène la résonance plasmon de surface (SPR). Par contre, hors résonance, la structure réfléchit la lumière incidente en totalité.

Grâce à ces informations, on peut tracer la courbe dite SPR, c'est-à-dire, l'intensité en fonction de l'angle réfléchi. Au minimum d'intensité de la lumière réfléchie, on a l'angle de résonance θ (cf. Figure 128.A.)

Tout changement de la composition de l'interface entre le film d'or et le milieu extérieur, tel que l'interaction d'un analyte sur des ligands immobilisés sur le film d'or, va modifier les caractéristiques des plasmons de surface et donc celles de l'onde évanescente. Ainsi, la résonance plasmon de surface apparaîtra à un angle d'incidence différent et donc donnera un angle réfléchi différent. Ce déplacement est directement proportionnel au changement de masse sur le film d'or.

On peut alors tracer le sensorgramme c'est-à-dire le changement de l'angle de résonance en fonction du temps (cf. Figure 128.B.).

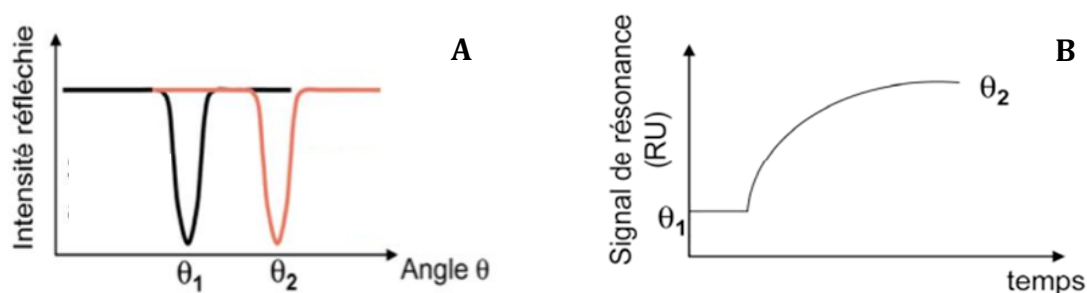


Figure 128 - Données de l'analyse Biacore® avec θ_1 angle de résonance en début d'analyse et θ_2 celui en cours (A. Intensité réfléchie en fonction de son angle, B. Sensorgramme).

B. Application aux biomolécules

1. Une analyse Biacore®

Lorsqu'on applique ce principe à l'analyse de biomolécules, on fonctionnalise tout d'abord le film d'or de 'ligands'. Leur nature dépend de la molécule à tester.

Les macromolécules de masses molaires supérieures à 5000 daltons sont de masses suffisantes pour être détectées lors de leurs interactions avec un récepteur mis sur le film d'or du Biacore®. Le 'ligand' est alors le récepteur, c'est le cas d'une lecture directe (cf. Figure 129.A.).

En revanche, pour des molécules plus petites, leurs masses ne seront pas suffisantes pour être détectées. On prend alors un autre ligand du récepteur étudié, on repère deux cas :

- Si celui-ci est facilement attachable au film d'or et de masse assez importante, il devient 'ligand'. Le récepteur est alors en solution et interagira avec l'un ou l'autre des ligands disponibles. On est dans le cas d'un test d'inhibition (cf. Figure 129.B.²⁰⁶);
- Sinon, il est choisi de taille importante et le 'ligand' est alors le récepteur, on est alors dans le cas d'un test de compétition (cf. Figure 129.C.²⁰⁶).

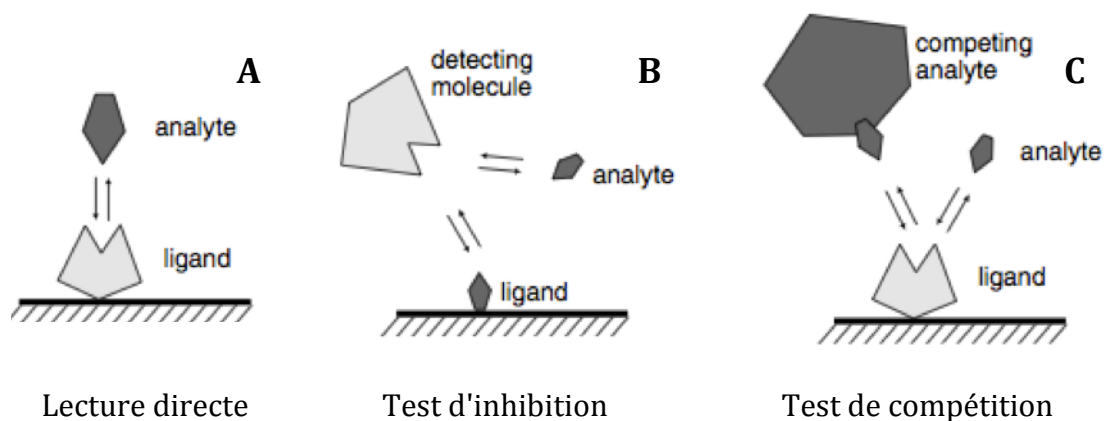


Figure 129 - Illustration de 3 différentes approches d'expérience Biacore® (A. Lecture directe pour des molécules >5000 daltons, B. Test d'inhibition pour des molécules <5000 daltons et facilement accrochables sur le support, C. Test de compétition pour des molécules <5000 daltons et non facilement accrochables sur le support).

Une analyse se fait en quatre phases (cf. Figure 130²⁰⁷) :

1. Une phase de blanc pour avoir la ligne de base.

Pour cela, on fait passer un flux constant de tampon à travers le milieu extérieur du film d'or. Cela donne un premier angle de résonance θ_1 .

2. Une phase d'association.

La molécule à tester, appelé analyte, est solubilisée dans le tampon à une concentration donnée. L'interaction de celle-ci avec le ligand est suivie en continu par le changement de l'angle de résonance. Ce dernier augmente jusqu'à arriver à un palier correspondant à la saturation de la surface / équilibre.

3. Une phase de dissociation.

L'excès d'analyte est enlevé en remplaçant le flux tampon-analyte par du tampon. Il en découle une diminution de l'angle de résonance et l'obtention d'un nouveau palier, dont l'écart avec la ligne de base est représentatif de la masse d'analyte réellement liée au ligand.

4. Une phase de régénération.

L'ajout d'une solution régénérante permet de dissocier totalement les complexes et de revenir à la ligne de base. Une nouvelle analyse peut alors être effectuée avec une concentration en analyte différente de la précédente.

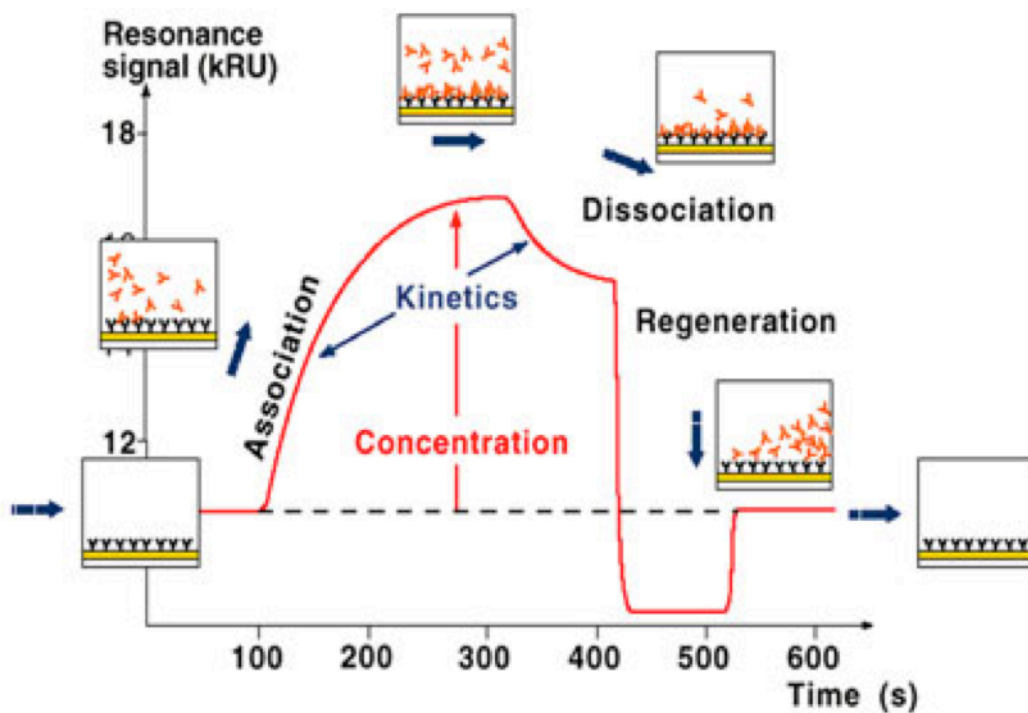


Figure 130 - Sensorgramme représentant les 4 phases d'une analyse Biacore®.

2. Traitement des données

Pour avoir l'affinité de l'interaction entre deux molécules, plusieurs sensorgrammes de concentrations d'analyte différentes sont nécessaires. La plage de concentration doit être choisie avec minutie, elle doit au moins contenir 5 analyses et comprendre deux fois le K_D .

De chaque analyse, on déduit un niveau de réponse d'interaction correspondant au niveau absolu de celui-ci à un temps t d'équilibre de l'interaction auquel on retranche le niveau de la ligne de base (cf. Figure 131).

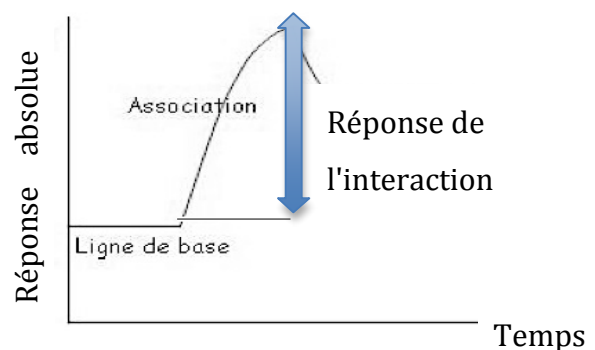


Figure 131 - Calcul de la réponse de l'interaction grâce au sensorgramme.

Ces niveaux de réponse de l'interaction sont traduits en pourcentage de réponse par rapport à une référence. Pour la lecture directe, il s'agit du plus haut taux d'interaction trouvé en augmentant la concentration en analyte. Pour le test d'inhibition et celui de compétition, il s'agit de la valeur du niveau de réponse de l'analyse sans analyte mais avec respectivement le récepteur ou l'analyte compétiteur.

Une courbe de réponse est ainsi tracée avec le niveau de réponse en pourcentage en fonction de la concentration en analyte. A 50% se trouve la concentration inhibitrice médiane, IC_{50} (cf. Figure 132).

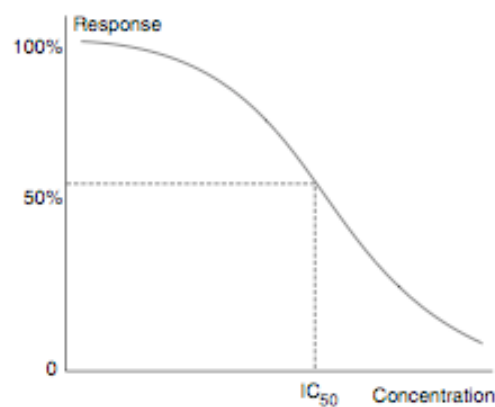


Figure 132 - Calcul de l' IC_{50} grâce à la courbe de réponse.

II. Expériences de Biacore®

A. Conditions d'analyses

L'analyse de l'avidité/effet cluster permet d'avoir l'intensité de l'ensemble des forces des interactions non-covalentes entre une macromolécule biologique et un ligand multivalent. Cette avidité n'est pas seulement l'addition des affinités, c'est-à-dire l'addition de chaque force d'interaction entre les deux protagonistes, elle prend en compte l'effet multivalent (cf. Figure 133). Cette information est disponible en comparant les affinités de différents analytes comportant différentes valences.

Certains des glycodendrimères à tester ont une masse molaire inférieure à 5000 daltons, ce qui a exclu la méthode à lecture directe. Un autre ligand de DC-SIGN, la Man-BSA, a alors été choisie. Celle-ci étant facilement attachable sur la puce de Biacore® et de masse assez importante, elle a permis d'effectuer des tests d'inhibition.

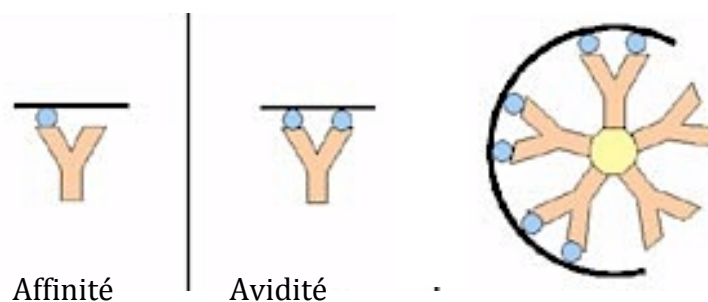


Figure 133 - Représentation schématique de la différence entre affinité et avidité.

De l'albumine de sérum bovin fonctionnalisée par des mannoses (Man-BSA) a été greffée sur une puce de SPR CM4 fonctionnalisée par des dextrans. La BSA mannosylée contient 15 Man- α 1-3(man α 1-6)Man trisaccharides.

Pour les analyses suivantes, on cherche une concentration optimale en récepteur, le tétramère EDC DC-SIGN, à injecter à chaque analyse. Pour cela, une série de mesures de concentrations croissantes en récepteur a été faite pour donner l'isotherme d'interaction, c'est-à-dire la courbe de la quantité d'analyte interagissant avec le ligand en fonction de sa concentration. La concentration prise en référence est celle donnant une interaction maximale avec le ligand, la Man-BSA. Dans notre cas, elle est de 20 μM (cf. Figure 134).

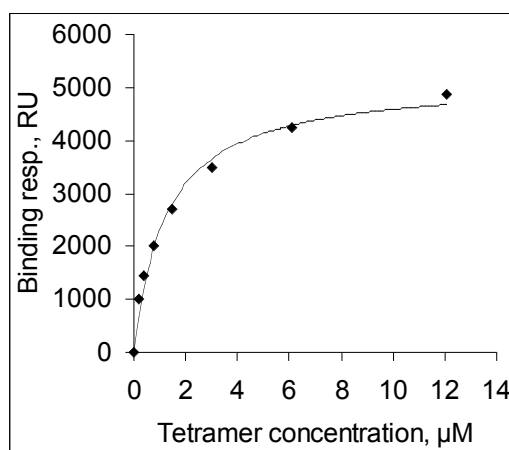


Figure 134 - Isotherme d'interaction de EDC DC-SIGN sur la Man-BSA.

Un premier sensorgramme de référence a été fait en injectant que le récepteur à la concentration définie précédemment. L'étude d'inhibition comporte plusieurs sensorgrammes de concentrations croissantes en analyte (0.21 μM -6200 μM) mais de concentration fixe en EDC DC-SIGN. Le récepteur utilisé va avoir le choix d'interagir avec l'analyte ou Man-BSA suivant son affinité avec eux.

Le niveau de réponse à l'équilibre, soit vers 160 secondes, de chaque concentration d'un composé donné a été traduit en pourcentage de réponse par rapport à celui de la référence, permettant de tracer la courbe de réponse de l'analyte.

Après chaque cycle, une solution régénérante contenant de l'EDTA a été utilisée étant donné qu'elle va coordonner les ions calciums nécessaires à l'interaction avec l'EDC DC-SIGN.

B. Etat de l'art

Le Biacore® est utilisé par de multiples groupes de recherche pour évaluer l'interaction entre DC-SIGN et des structures glycosylées, donnant ainsi une information sur l'affinité de ces dernières^{208, 209}. Parmi les différentes lectures possibles, les exemples montrés utilisent la même méthode de Biacore® que celle utilisée pour nos dendrimères : des tests d'inhibitions comportant de la Man-BSA fixée sur la puce de SPR et des tétramères de CRD de DC-SIGN en solution.

Les monosaccharides les plus communs ont d'abord été testés, montrant une préférence d'interaction de DC-SIGN pour les mannoses et les L-fucoses, respectivement une IC_{50} de 3292 et 1200 μ M, par rapport au Glc ou au Gal (cf. Tableau 11).

Ces informations ont permis d'orienter les tests d'inhibitions vers des structures saccharidiques plus complexes comme Lewis X, contenant un fucose, et un dérivé de $Man\alpha(1-2)Man$ (cf. respectivement Tableau 11 et l'entrée 1 du Tableau 12). Dans les deux cas, une diminution importante de l' IC_{50} par rapport aux entités monosaccharidiques a été remarquée, de 1200 à 800 μ M pour le premier et de 3292 à 1018 μ M pour le second.

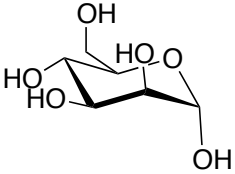
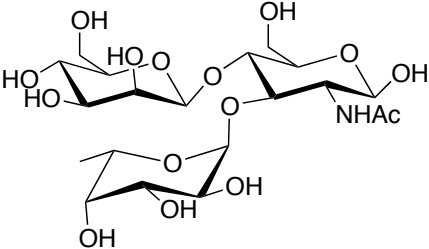
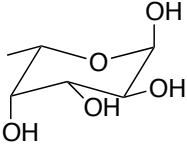
Composé de valence 1	$IC_{50}(\mu M)$	Composé de valence 1	$IC_{50}(\mu M)$
 Mannose	3292	 Lewis X	800
 L-Fucose	1200		

Tableau 11 - IC_{50} de composés de valence 1.

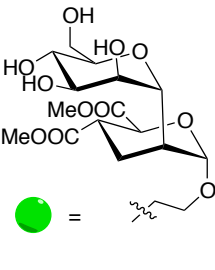


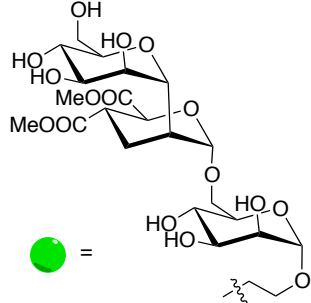



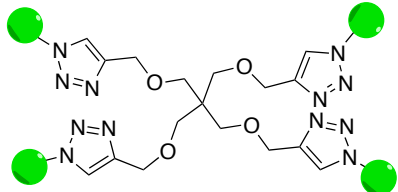
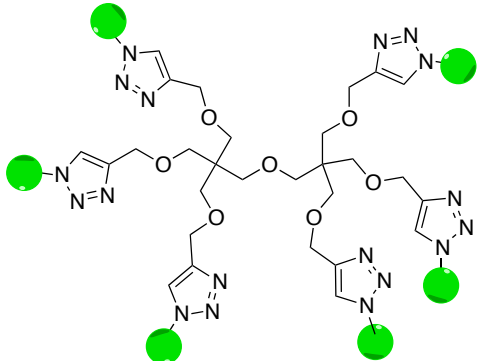
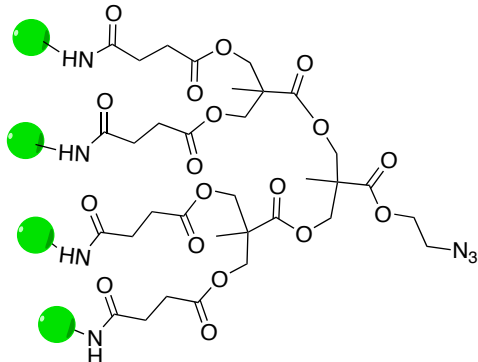
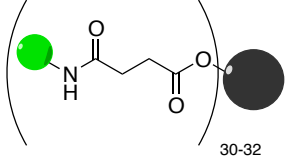
Entrée	Composé	IC ₅₀ (μM)		Valence
		di	tri	
		  = 	  = 	
1	 -N ₃	1018	145	1
2		136	112	4
3		39	51	6
4		227	/	4
5	 30-32	2	1.25	30-32

Tableau 12 - IC₅₀ de composés des disaccharides ou des trisaccharides.

S'ensuit la question de la complexité nécessaire du saccharide à l'amélioration de l'affinité, en d'autres termes si le passage d'un disaccharide ou un trisaccharide est vraiment bénéfique pour l' IC_{50} . Parmi les études existantes, Varga et al. ont testé des glycodendrimères de valence 4 et 6 comportant soit un mono-, soit un di- soit un trisaccharide dérivé du mannose (cf. entrée 1 à 3 du Tableau 12)²¹⁰.

Ils ont trouvé que l' IC_{50} du trisaccharide monovalent, 145 μM , était bien plus faible que le di- ou le monosaccharide, respectivement de 1018 μM et de 3292 μM . Cependant, cette différence est rapidement rattrapée par les glycodendrimères disaccharidiques de valence de 4.

De plus, le bénéfice de la multivalence, c'est-à-dire l'avidité, est bien moins important pour le trisaccharidique que pour le disaccharidique. En effet, pour des glycodendrimères de même valence, une IC_{50} moins élevée est obtenue pour ce dernier (cf. entrées 2 et 3 du Tableau 12).

Cette observation peut être mesurée par le calcul de β , paramètre exprimant l'amélioration de l'affinité d'un ligand multivalent par rapport à une référence monovalente développé par Whitesides et al.. Celui-ci peut être défini par l' IC_{50} de l'espèce monovalente sur l' IC_{50} de l'espèce étudiée qui est multiplié par sa valence. Ainsi, pour les dendrimères de valence 4 et 6 le β obtenu est respectivement de 1.87 et 4.35 pour les disaccharidiques, et 0.32 et 0.42 pour les trisaccharidiques.

En comparant des glycodendrimères portant le même saccharide mais ayant des structures différentes (cf. entrée 2 et 4 du Tableau 12)²¹¹, on s'aperçoit qu'il existe bien un effet de structure.

Parmi les structures existantes, on remarque deux glycodendrimères portant des monosaccharides²¹⁰, un de valence 9 (cf. entrée 1 du Tableau 13) et un autre de valence 18 (cf. entrée 2 du Tableau 13), ayant respectivement une IC_{50} de 128 μM et 36 μM . Parmi celles hautement glycosylées, le glycopolymère de type Boltorn® dissaccharidique de valence 30 à 32 (cf. entrée 5 du Tableau 13), synthétisé par Luczkowiak et al., a donné une IC_{50} de 2 μM ²¹¹. Dans ces trois cas, une importante diminution par rapport à l' IC_{50} du mannose seul a été notée.

L'intervalle des valences de ces glycodendrimères correspond à celui de nos glycodendrimères synthétisés, ils permettront ainsi de comparer les résultats d'IC₅₀ obtenus.

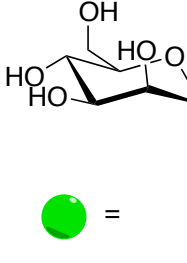
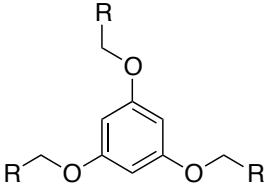
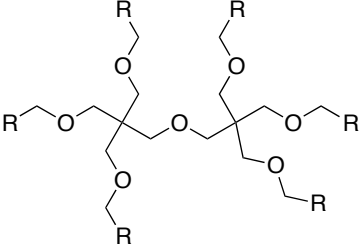
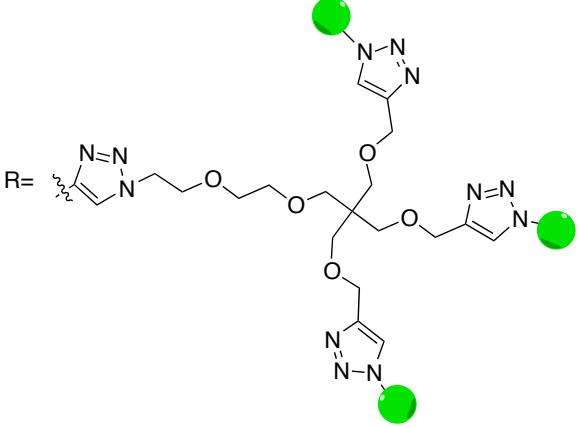
Entrée	Composé	IC ₅₀ (μM)	Valence
		mono	
			
1		128	9
2		36	18
			

Tableau 13 - IC₅₀ de composés portant des monosaccharides.

C. Résultats et Discussion

L'interaction entre nos dendrimères et DC-SIGN fut évaluée par le groupe de M. Fieschi à l'institut de Biologie Structurale (IBS) de Grenoble dans les conditions discutées précédemment^{211, 212, 213., 214.}

Pour calibrer le test d'inhibition, du mannose et du L-fucose ont été utilisés comme références monosaccharidiques. L'énantiomère non naturel D-fucose a été utilisé comme contrôle négatif. Les IC_{50} obtenues sont consistantes avec celles de la littérature, respectivement de 2.8mM et de 1.7mM.

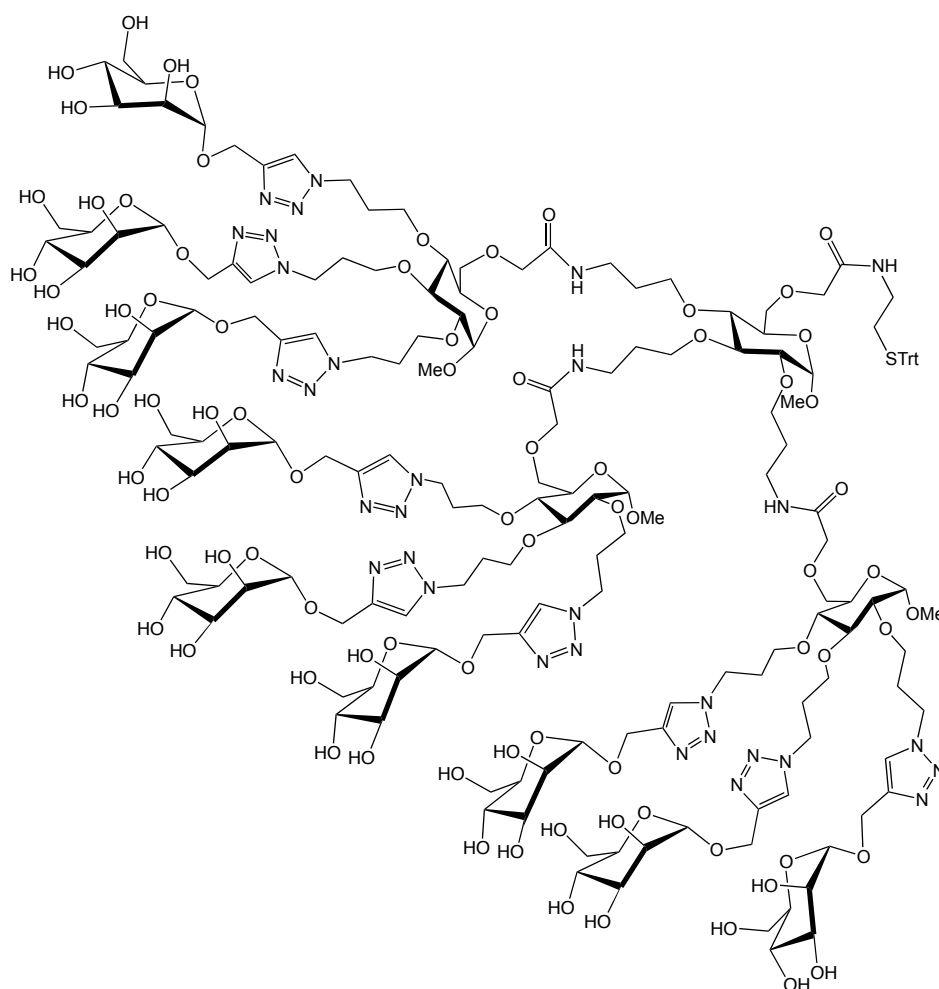


Figure 135 - Dend9Mannoses.

Les études biologiques des dendrimères synthétisés sont en cours. Cependant, des résultats préliminaires ont été faits sur deux dendrimères proches de ceux de

valence 9 et 27 issus de l' α -D-glucopyranoside de méthyle. Ils ont été synthétisés d'une tout autre manière dans le laboratoire (L. Cattiaux), comportent les mêmes valences mais sont enveloppés de mannoses (cf. Figure 135 pour Dend9Mannoses et Figure 136 pour Dend27Mannoses).

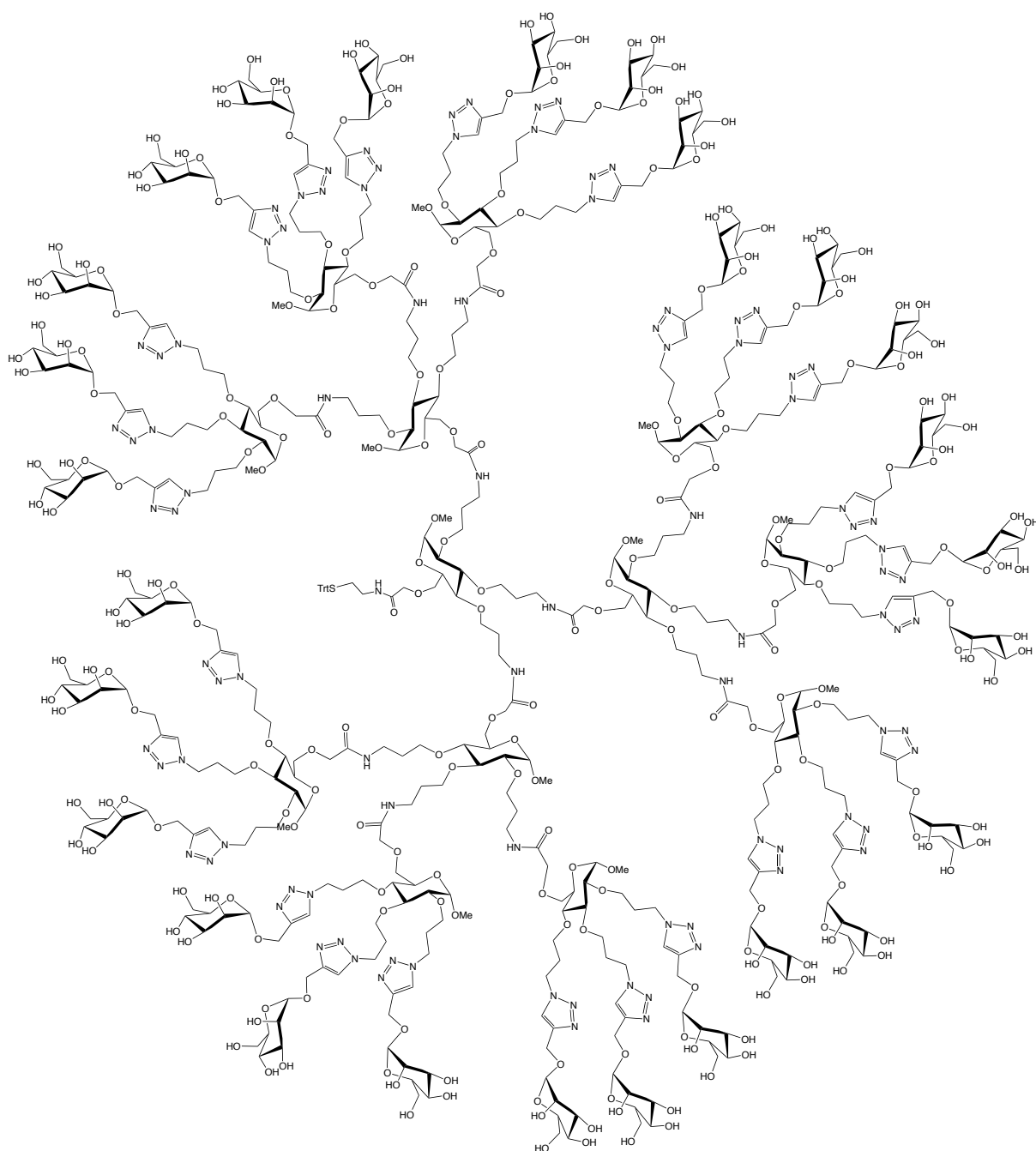


Figure 136 - Dend27Mannoses.

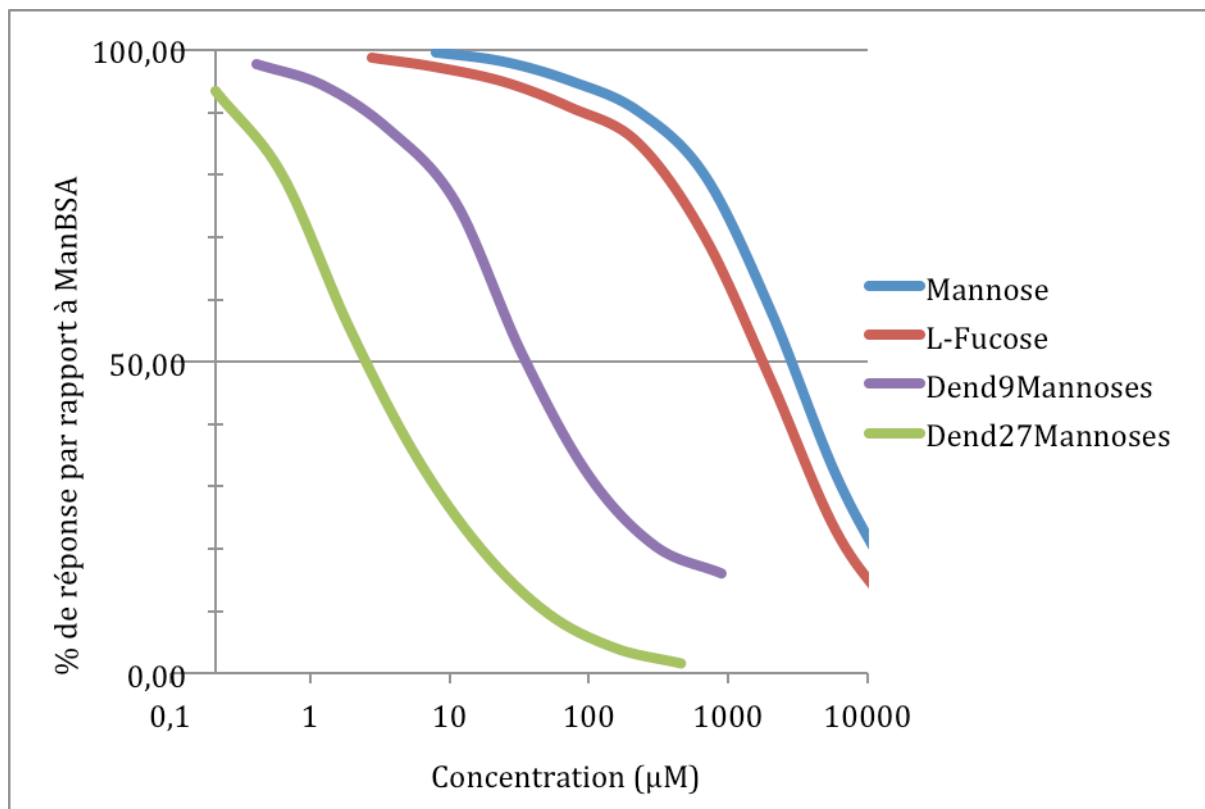


Figure 137 - Courbe de réponse des glycodendrimères Dend9Mannoses et Dend27Mannoses.

La courbe de réponse est donnée en Figure 137. Les IC_{50} des molécules étudiées en sont déduites et rassemblées dans le Tableau 14. Une forte diminution de cette valeur a été observée lorsqu'on passe du monosaccharide au glycodendrimère de valence 9, de 2931 μM à 30 μM , baisse qui s'accroît lorsqu'on augmente la valence à 27 où l' IC_{50} passe de 30 μM à 2.6 μM .

Par rapport à d'autres molécules glycosylées avec des monosaccharides et comportant des valences analogues (cf. entrée 1 et 2 du Tableau 13), l' IC_{50} obtenue avec Dend9mannoses est bien plus faible.

Dans le cas du glycodendrimère à 27 mannoses, l' IC_{50} de 2.6 μM se rapproche de celle du glycopolymère de type Boltorn® (cf. entrée 5 du Tableau 12) alors que ce dernier porte une partie saccharidique ayant plus d'affinité avec DC-SIGN.

Un changement des mannoses en dérivé de $Man\alpha(1-2)Man$ devrait encore diminuer l' IC_{50} . Au vu de la valeur de l' IC_{50} bien plus faible du L-Fucose par rapport au mannose, la même observation devrait être obtenue pour les glycodendrimères **15a** et **20a** synthétisés.

Lorsqu'on regarde l'amélioration de l'affinité d'une valence à une autre, β , on trouve un effet très marqué allant de 10 pour le glycodendrimère ayant 9 mannoses et de 40 pour celui de 27.

Composé	Valence	IC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (μM)*Valence	β
Fucose	1	1766.1		
Mannose	1	2831		
Dend9Mannoses	9	30	270	10
Dend27Mannoses	27	2.6	70	40

Tableau 14 - Valeurs des IC₅₀ des monosaccharides et dendrimères testés.

III. Conclusion

Les interactions biologiques entre DC-SIGN et les glycodendrimères synthétisés sont analysées grâce à un test d'inhibition avec de la Man-BSA par Biacore®. Les études sont exécutées par l'équipe de M. Fieschi à l'institut de biologie structurale de Grenoble.

L'étude des glycodendrimères **15a** et **20a** est en cours. Cependant, une idée de l'ordre de grandeur de leur IC_{50} a pu être obtenue grâce à des glycodendrimères proches de ceux synthétisés. Un effet multivalent ainsi qu'une diminution importante de l' IC_{50} , jusqu'à 1000 fois celle de l'entité mosaccharidique, le mannose, ont été observés. De meilleurs résultats ont été trouvés pour le glycodendrimère de valence 27, cependant, cette diminution n'est pas assez importante pour contre-balancer la difficulté de synthèse et de caractérisation de ce dernier. La différence d' IC_{50} pourrait être rattrapée en modifiant la partie saccharidique des dendrimères.

Il est donc préférable de continuer le développement des glycodendrimères de valence 9 avec d'autres structures comme l'utilisation des différents blocs synthétisés auparavant et le changement de la partie saccharidique.

CONCLUSION GENERALE

Les cellules dendritiques permettent de passer d'une réponse immunitaire non spécifique (destruction du non-soi) à une réponse immunitaire spécifique (destruction de tel organisme). Cette dernière se caractérise par l'expansion clonale amplifiant la réponse spécifique à un pathogène et la mise en place d'une mémoire immunitaire.

L'efficacité des cellules dendritiques dans leur rôle de sentinelle est due à la grande diversité des récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires exprimés à leur surface. On s'intéresse plus particulièrement à celui appelé DC-SIGN. Pour augmenter l'interaction faible entre une unité glycosidique et ce récepteur, des ligands multivalents sont nécessaires. Différentes structures existent : glycoclusters, glycopolymères, glyconanoparticules, et enfin les glycodendrimères. Ces derniers, bien définis et donnant des valences importantes, ont été choisis pour notre projet. Ils peuvent être divisés en 3 catégories mais seulement deux vont être exploitées par la suite : celle dont le coeur et l'enveloppe sont des éléments glycosylés et celle où seulement l'enveloppe porte des saccharides.

Ce projet consiste au développement d'une stratégie de synthèse de glycodendrimères ayant une forte affinité pour DC-SIGN pouvant être appliquée à différents monomères. Cette stratégie, passant par un support solide, permet une modulation importante du coeur du glycodendrimère formé mais aussi de sa structure globale.

Pour leur fabrication, deux blocs multi-branchés sont nécessaires : un bloc dit Elongateur finissant par des amines protégées, et un autre dit Termineur finissant par des azotures. Leurs synthèses ont été développées sur l' α -D-glucopyranoside de méthyle et appliquées avec succès sur d'autres monomères : le pentaérythritol et le D-mannitol.

L'assemblage du glycodendrimère sur support solide a été ensuite testé avec les blocs issus de l' α -D-glucopyranoside de méthyle avec succès pour donner deux glycodendrimères, un portant 9 fucoses et un autre 27. Les autres blocs synthétisés n'ont pas pu être exploités pour l'instant. Grâce à cette technique, les purifications ont été limitées au glycodendrimère final et malgré les difficultés impliquées, celui de valence 9 a été bien caractérisé par MALDI.

Des changements de synthèse ont été testés pour améliorer l'efficacité de la stratégie de synthèse en supprimant, par exemple, la nécessité du bloc Elongateur grâce à la réduction du bloc Termineuse directement sur support solide. Des résultats préliminaires ont été trouvés mais reste à approfondir.

Les interactions biologiques entre DC-SIGN et les glycodendrimères synthétisés sont analysées par l'institut de biologie structurale de Grenoble grâce à une technique de Biacore®. L'étude des glycodendrimères synthétisés est en cours, néanmoins un ordre d'idée peut être obtenu grâce à des résultats préliminaires obtenus sur des glycodendrimères proches de ceux synthétisés et mannosylés. Ainsi, un effet multivalent ainsi qu'une diminution importante de l'IC₅₀, jusqu'à 1000 fois celle de l'entité mosaccharidique, ont été observés.

De meilleurs résultats ont été trouvés pour le glycodendrimère de valence 27, cependant, cette diminution n'est pas assez importante pour contre-balancer la difficulté de synthèse et de caractérisation de ce dernier. Il est donc préférable de continuer le développement des glycodendrimères de valence 9 avec d'autres structures comme l'utilisation des différents blocs synthétisés auparavant et le changement de la partie saccharidique.

PARTIE

EXPERIMENTALE

I. Organic Synthesis

A. Warnings

1. Warning about sodium azide

Sodium azide when inhaled is highly toxic and may cause death. Precautions must be taken when weighing the material such as using a powder mask and a Teflon spatula (metallic spatula may cause explosion). Azidation reactions were performed behind a plastic shield due to potential explosion. DMF is used as a polar solvent favoring the reaction but also to maintain a slightly basic pH (>8) of the solution.

DCM and CHCl_3 are avoided since they can react with azide ion and formed toxics and explosives products (respectively di- and triazidomethane).

With acidic pH, hydrazoic acid (HN_3) may be formed, which may explode and/or, when inhaled, may cause intoxication, damage of the central nervous system and blood pressure effects.

2. About product preparation

All reagents were purchased from commercial suppliers and used without further purification unless noted otherwise. Flash chromatography were performed using silica gel 60 F₂₅₄ (E. Merk) with flash chromatography instrument (Armen Spot 2 model). Analytical thin layer chromatography (TLC) were performed using silica gel 60 F₂₅₄. Development of TLC plates were achieved by heating plates with a sulphuric acid indicator as a carbohydrate specific staining solution or with a Vanilline one as a universal staining solution. The former was prepared with a 10% sulphuric acid solution in ethanol and the latter with the dissolution of 10g of Vanilline in 100mL of sulfuric acid/ethanol (40/10).

3. About product characterization

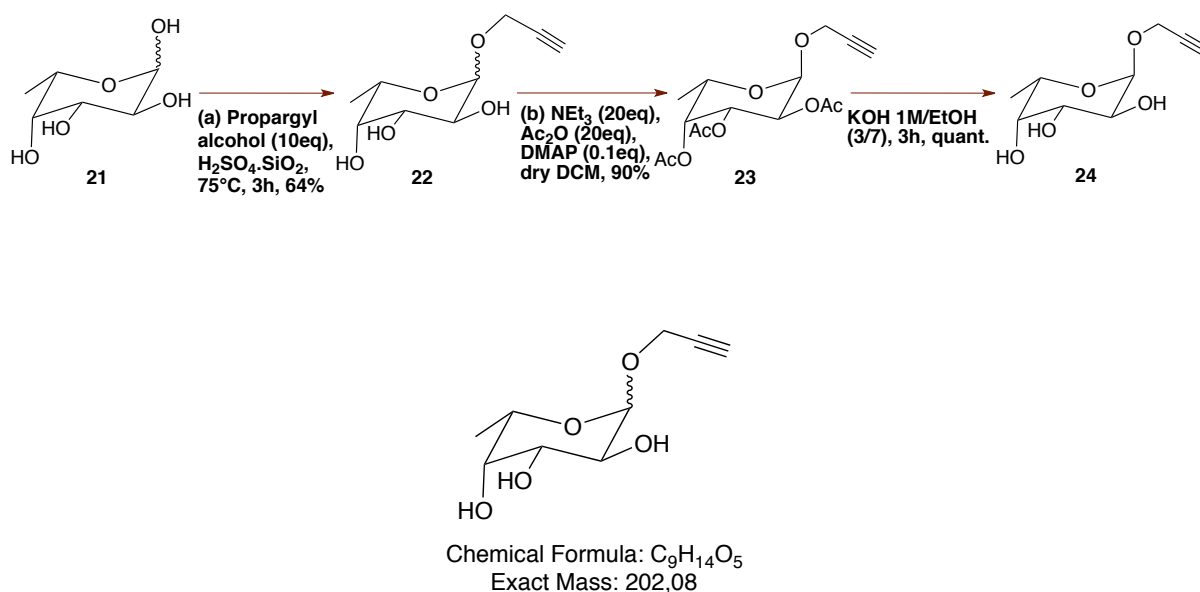
NMR: NMR spectra were recorded on a 300MHz Bruker spectrometer. Proton chemical shifts are reported in parts per million (ppm) downfield from tetramethylsilane (TMS) Coupling constants (J) are reported in hertz (Hz). Carbon chemical shifts are reported in

parts per million (ppm) with reference to internal solvent CDCl_3 (77.16 ppm) unless noted otherwise. Multiplicities are abbreviated as follows: singlet (s), doublet (d), triplet (t), quartet (q), multiplet (m), broad (br) and apparent (app.).

Optical rotations were measured with a Perkin- Elmer Model 241 digital polarimeter at $22 \pm 3^\circ\text{C}$

High-resolution mass spectra (HRMS) were obtained on a Bruker hybride APEX spectrometer (ESI) and are given as experimental (calcd) and theoretical (found).

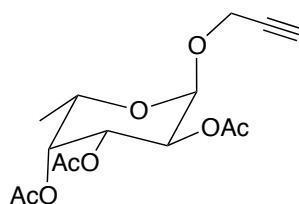
B. Experimental part: L-Fucose

Propargyl (α , β)-L-Fucopyranoside (**22**)

First was prepared **H₂SO₄.SiO₂**: Silice (500mg) was mixed with dry Ether (2.5mL) on an evaporator. H₂SO₄ (0.15mL) was added. The mixture was stirred 5min at room temperature before evaporating ether. The crude product was dried at 110°C for 3h.

Then, **L-Fucose** (4.874mmol, 800mg) was dissolved in propargyl alcohol (73.104mmol, 4.2mL, 15eq) under argon atmosphere. The mixture was stirred 5 minutes at 75°C before adding H₂SO₄.SiO₂ (96mg). The mixture was stirred for 3 hours at 75°C.

The crude product was cooled down to room temperature and then directly purified by silica gel chromatography (DCM then EtOAc/MeOH 95/5) to obtain **22** (627mg, 64%) as a white solid.



Chemical Formula: $C_{15}H_{20}O_8$
Exact Mass: 328,12

Propargyl 2,3,4-tri-O-acetyl- α -L-Fucopyranoside (23)

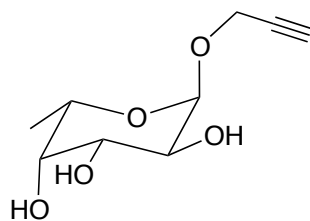
22 (1.012mmol, 204.4mg) was placed under argon atmosphere, then dry DCM (10mL), NEt_3 (20.230mmol, 2.8mL, 20eq), Ac_2O (20.230mmol, 1.9mL, 20eq), DMAP (0.101mmol, 12mg, 0.1eq) were added. The mixture was stirred 5h at room temperature.

H_2O at $0^\circ C$ (12mL) was added. The solution was diluted in DCM (50mL), washed with a saturated solution of $NaHCO_3$ (3x50mL) and brine (3x50mL). The organic layer was dried ($MgSO_4$), filtered and concentrated *in vacuo*. The crude product was purified by silica gel chromatography (Cyclohexane/ $EtOAc$: 15min at 80/20 then 15min at 70/30) to obtain only **23** (298.8mg, 90%) as a white solid.

R_f = 0.29 ($AcOEt/MeOH$ 95/5).

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 5.30-5.20 (m, 2H, H_3, H_4), 5.18 (d, 1H, $J=3.3Hz, H_1$), 5.07 (dd, 1H, $J=10.7, 3.3Hz, H_2$) 4.20 (d, 1H, $J=2.5Hz, OCH_2CCH$), 4.18- 4.11 (m, 1H, H_5), 2.49-2.46 (m, 1H, C_qCH), 2.11 (s, 3H, $COCH_3$), 2.02 (s, 3H, $COCH_3$), 1.92 (s, 3H, $COCH_3$), 1.08 (d, 3H, $J=6.5Hz, CHCH_3$).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 170.4 ($COCH_3$), 170.2 ($COCH_3$), 169.8 ($COCH_3$), 94.9 (C_1), 78.6 (C_qCH), 75.0 (C_qCH), 70.9 ($CHCOCH_3$), 67.7 ($CHCOCH_3$), 67.6 ($CHCOCH_3$), 64.9 ($CHCOCH_3$), 55.1 (OCH_2C_qCH), 20.7 ($COCH_3$), 20.6 ($COCH_3$), 20.5 ($COCH_3$), 15.6 ($CHCH_3$).



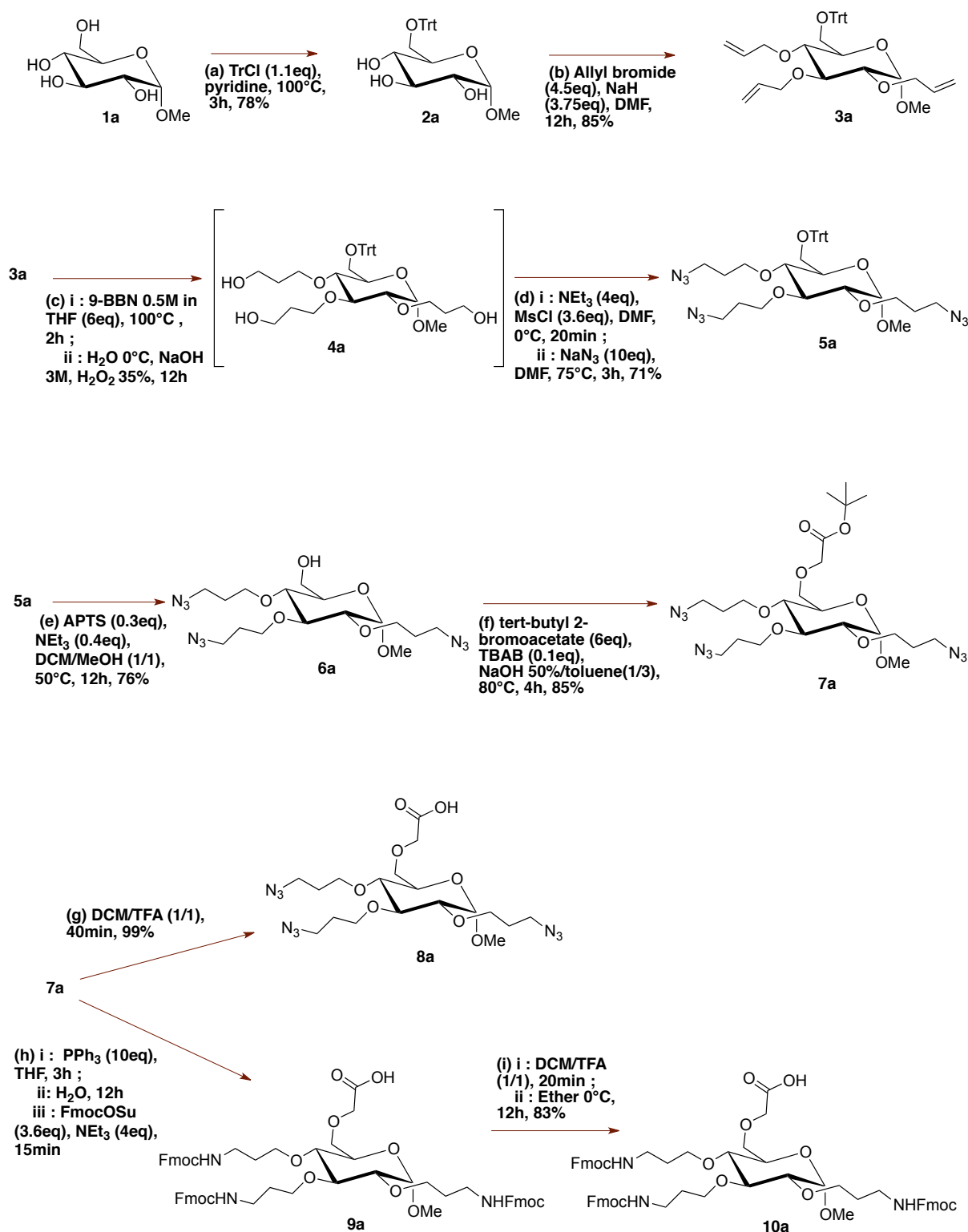
Chemical Formula: $C_9H_{14}O_5$
Exact Mass: 202,08

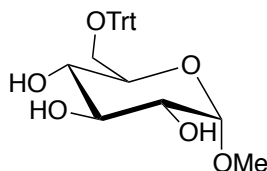
Propargyl α -L-Fucopyranoside (24)

To a solution of **23** (1.880mmol, 617mg, 1eq) in EtOH (43mL), KOH 1M (16mL) was added. The mixture was stirred 3h at room temperature. The crude product was neutralized with IR120 and then filtered. The filtrate was concentrated *in vacuo*. The residue was purified by silica gel chromatography (Cyclo/EtOAc: 3min at 7/3, DCM/MeOH: 95/5 then 80/20) to obtain **24** as a white solid.

^1H NMR (300 MHz, D_2O) δ 5.00 (d, 1H, $J=3.3\text{Hz}$, H_1), 4.27-4.26 (m, 2H, OCH_2CCH), 4.07-4.05 (m, 1H, H_5), 3.82-3.73 (m, 3H, H_2 , H_3 , H_4), 2.86-2.84 (m, 1H, OCH_2CCH), 1.17 (d, 3H, $J=6\text{Hz}$, CH_3).

^{13}C NMR (75 MHz, D_2O) δ 97.7 (C_1), 79.2 (C_qCH), 75.8 (C_qCH), 71.8 (C_4), 69.5 (C_3), 67.7 (C_2), 67.2 (C_5), 55.1 ($\text{OCH}_2\text{C}_q\text{CH}$), 15.2 (CHCH_3).

C. Experimental Part: Methyl α -D-glucopyranoside




Chemical Formula: $C_{26}H_{28}O_6$
Exact Mass: 436,19

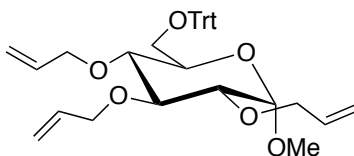
Methyl 6-O-triphenylmethyl-α-D-glucopyranoside (2a)

To a solution of **1a** (46.4g, 240mmol, 1eq) in Pyridine (700mL) placed under argon atmosphere, Trityl chloride (73.2, 262mmol, 1.1eq) was added. The mixture was stirred at 100°C for 3h. The mixture was concentrated *in vacuo*. The residue was dissolved in DCM (300mL), washed with 1M HCl (3x100mL), a saturated solution of $NaHCO_3$ (3x100mL) and with brine (3x100mL). The organic layer was dried ($MgSO_4$), filtered and concentrated *in vacuo*. The crude product was recrystallized with toluene to obtain **2a** (81.18g, 78%) as a white solid.

ESI-HRMS m/z $[M+Na]^+$ calculated for $C_{26}H_{28}NaO_6$: 459.1784, found: 459.1789.

1H NMR (300 MHz, Acetone- d_6) δ 7.56-7.31 (m, 15H, $H_{ar}Tr$), 4.77 (d, $J = 3.6$ Hz, 1H, H_1), 4.27 (br, 1H, OH), 4.11 (br, 1H, OH), 3.86-3.78 (m, 2H, H_4 , H_5), 3.67 (t, $J = 9.1$ Hz, 1H, H_3), 3.51 (s, 3H, $CHOCH_3$), 3.49-3.42 (m, 2H, CH_2OTrt , H_2), 3.39-3.24 (m, 2H, H_4 , CH_2OTrt).

^{13}C NMR (75 MHz, Acetone- d_6) δ 145.4 (C_qTrt), 129.7 ($C_{ar}Trt$), 128.6 ($C_{ar}Trt$), 127.8 ($C_{ar}Trt$), 100.9 (C_1), 87.1 (C_qPh_3), 75.6 (C_3), 73.5 (C_2), 72.2 (C_4), 72.0 (C_5), 64.9 (CH_2OTrt), 55.3 (OCH_3).



Chemical Formula: $C_{35}H_{40}O_6$
Exact Mass: 556,28

Methyl 2,3,4-tri-O-allyl-6-O-triphenylmethyl-α-D-glucopyranoside (2a)

To a solution of **2a** (81.1g, 0.186mol, 1eq) in DMF (400mL) placed under argon atmosphere, Allyl bromide (56.27mL, 0.836mol, 4.5eq) and NaH 60% (16.72g, 0.697mol, 3.75eq) were slowly added. The mixture was stirred overnight at room

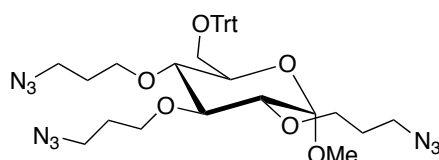
temperature. MeOH (50mL) was added. Then, the solution was concentrated *in vacuo*. The residue was dissolved in DCM (200mL) and washed with brine (3x100mL). The organic layer was dried (MgSO₄), filtered and concentrated *in vacuo*. The crude product was purified by silica gel chromatography (Cyclohexane/EtOAc: 3min at 100/0, 10min at 95/5 then 10min at 90/10) to obtain **3a** (87.77g, 85%) as a colorless oil.

R_f=0.76 (Cyclohexane/EtOAc 7/3).

[α]_D 62 (c 1, CHCl₃). ESI-HRMS m/z [M+Na]⁺ calculated for C₃₅H₄₀NaO₆: 579.2723, found: 579.2737.

¹H NMR (300MHz, CDCl₃) δ 7.43-7.12 (m, 15H, *H*_{ar}Trt), 5.94-5.82 (m, 2H, OCH₂CHCH₂), 5.48-5.38 (m, 1H, OCH₂CHCH₂), 5.28-5.85 (m, 6H, OCH₂CHCH₂), 4.78 (d, J=3.6Hz, 1H, H₁), 4.26-4.00 (m, 4H, OCH₂CHCH₂), 3.71-3.58 (m, 3H, H₅, OCH₂CHCH₂), 3.40-3.32 (m, 4H, CH₂OTrt, H₂, H₃, H₄), 3.38 (s, 3H, CHOCH₃), 3.02 (dd, J=10.0, 4.4Hz, 1H, CH₂OTrt).

¹³C NMR (75MHz, CDCl₃) δ 144.0 (*C*_qTrt), 135.3 (CHCH₂), 135.0 (CHCH₂), 134.7 (CHCH₂), 128.8 (*C*_{ar}Trt), 127.8 (*C*_{ar}Trt), 127.0 (*C*_{ar}Trt), 117.5 (CHCH₂), 116.9 (CHCH₂), 116.9 (CHCH₂), 98.1 (*C*₁), 86.3 (*C*_qPh₃), 81.8 (*C*₃), 79.7 (*C*₂), 78.0 (*C*₄), 74.6 (OCH₂CHCH₂), 73.8 (OCH₂CHCH₂), 72.6 (OCH₂CHCH₂), 70.1 (*C*₅), 62.6 (CH₂OTrt), 54.9 (OCH₃).



Chemical Formula: C₃₅H₄₃N₉O₆
Exact Mass: 685,33

Methyl 2,3,4-tri-O-(3-azidopropyl)-6-O-triphenylmethyl- α -D-glucopyranoside (5a)

9-BBN 0.5M in THF (200mL, 98.832mmol, 6eq) was added to **3a** (9.17g, 16.472mmol, 1eq) under argon atmosphere. The mixture was stirred at 100°C for 4h. Then, the reaction was cooled down at 0°C, H₂O at 0°C (50 mL), 3M NaOH (200mL) and H₂O₂ 35% (200mL) were slowly added. The mixture was stirred overnight at room temperature. The solution was diluted with DCM (200mL), washed with a saturated

solution of $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (3x100mL) and with brine (3x100mL). The organic layer was dried (MgSO_4), filtered and concentrated *in vacuo*.

The crude product was dissolved under argon atmosphere in DMF (40mL) and cooled down at 0°C. NEt_3 (9.2mL, 65.888mmol, 4eq) and MsCl (4.78mL, 59.299mmol, 3.6eq) were slowly added. The mixture was stirred at 0°C for 20min.

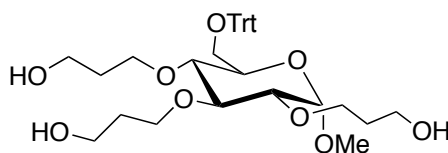
NaN_3 (10.71g, 164.720mmol, 10eq), DMF (20mL) and few drops of water were added. The mixture was stirred at 75°C for 3h. The solution was concentrated *in vacuo*. The residue was dissolved in EtOAc (100mL) and washed with brine (3x50mL). The organic layer was dried (MgSO_4), filtered and concentrated *in vacuo*. The crude product was purified by silica gel chromatography (Cyclohexane/EtOAc: 20min at 95/5, 15min from 95/5 to 90/10, 15min at 90/10 then 5min at 50/50) to obtain **5a** (8.017g, 71%) as a yellowish oil.

$R_f=0.79$ (Cyclohexane/EtOAc 7/3).

$[\alpha]_D^{+51}$ (c 1, CHCl_3). ESI-HRMS m/z $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calculated for $\text{C}_{35}\text{H}_{43}\text{N}_9\text{NaO}_6$: 708.3234, found: 708.3261.

^1H NMR (300MHz, CDCl_3) δ 7.42-7.14(m, 15H, $H_{ar}\text{Trt}$). 4.83 (d, $J=3.6\text{Hz}$, 1H, H_1), 3.81-3.55 (m, 6H, H_5 , $\text{OCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{N}_3$), 3.49-3.16 (m, 8H H_2 , H_3 , H_4 , CH_2N_3 , CH_2OTrt), 3.38 (s, 3H, CHOCH_3), 3.16-3.09 (m, 2H, $\text{OCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{N}_3$), 3.03-2.94 (m, 2H, CH_2OTrt , CH_2N_3), 2.86-2.78 (m, 1H, CH_2N_3), 1.87-1.73 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$), 1.47-1.30 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$).

^{13}C NMR (75MHz, CDCl_3) δ 143.9 ($C_q\text{Trt}$). 128.8 ($C_q\text{Trt}$), 127.8 ($C_{ar}\text{Trt}$), 127.1 ($C_{ar}\text{Trt}$), 97.4 (C_1), 86.3 ($C_q\text{Ph}_3$), 81.7 (C_3), 80.8 (C_2), 78.4 (C_4), 70.1 (C_5), 70.1 ($\text{OCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{N}_3$), 69.4 ($\text{OCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{N}_3$), 67.8 ($\text{OCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{N}_3$), 62.3 (CH_2OTrt), 55.0 (OCH_3), 48.5 (CH_2N_3), 48.3 (CH_2N_3), 29.8 (CH_2N_3), 29.5 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$), 28.5 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$), 29.5 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$).



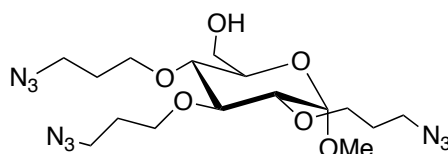
Chemical Formula: $C_{35}H_{46}O_9$
Exact Mass: 610,31

Methyl 2,3,4-tri-O-(3-hydroxypropyl)-6-O-triphenylmethyl- α -D-glucopyranoside (4a)

$[\alpha]_D^{25}$ 67 (c 1, $CHCl_3$). ESI-HRMS m/z $[M+Na]^+$ calculated for $C_{35}H_{46}NaO_9$: 633.3040, found: 633.3055.

1H NMR (300MHz, $CDCl_3$) δ 7.42-7.16 (m, 15H, $H_{ar}Trt$), 4.89 (d, $J=3.6$ Hz, 1H, C_1), 3.88-3.84 (t, $J=5.7$ Hz, 2H, CH_2OH), 3.75-3.68 (m, 6H, $OCH_2(CH_2)_2OH$), 3.43-3.28 (m, 5H, H_2 , H_3 , H_4 , H_5 , CH_2OTrt), 3.38 (s, 3H, OCH_3), 2.99 (dd, $J=10.0$, 4.4Hz, 1H, CH_2OTrt), 2.58 (s, 3H, CH_2OH), 1.82-1.74 (m, 4H, CH_2CH_2OH), 1.45-1.26 (m, 2H, CH_2CH_2OH).

^{13}C NMR (75MHz, $CDCl_3$) δ 143.8 (C_qTrt), 128.8 (C_qTrt), 127.8 ($C_{ar}Trt$), 127.0 ($C_{ar}Trt$), 97.0 (C_1), 86.3 (C_qPh_3), 81.3 (C_3), 80.3 (C_2), 78.6 (C_4), 72.3 ($OCH_2(CH_2)_2OH$), 70.9 ($OCH_2(CH_2)_2OH$), 70.3 (C_5), 69.1 ($OCH_2(CH_2)_2OH$), 62.1 (CH_2OTrt), 61.2 (CH_2OH), 61.0 (CH_2OH), 60.7 (CH_2OH), 55.0 (OCH_3), 32.6 (CH_2CH_2OH), 32.5 (CH_2CH_2OH), 32.2 (CH_2CH_2OH).



Chemical Formula: $C_{16}H_{29}N_9O_6$
Exact Mass: 443,22

Methyl 2,3,4-tri-O-(3-azidopropyl)- α -D-glucopyranoside (6a)

To a solution of **5a** (6.588g, 9.607mmol, 1eq) in DCM/MeOH (100mL/100mL), dry APTS (0.548g, 2.882mmol, 0.3eq) was added. The mixture was stirred overnight at 50°C. NEt_3 (0.54mL, 3.843mmol, 0.4eq) was added. Then, the solution was concentrated *in vacuo*. The residue was dissolved in DCM (200mL), washed with a saturated solution of $NaHCO_3$ (3x100mL) and with brine (3x100mL). The organic layer was dried ($MgSO_4$),

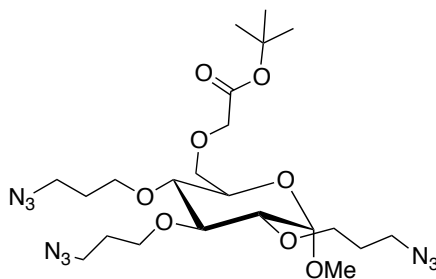
filtered and concentrated *in vacuo*. The crude product was purified by silica gel chromatography (Cyclohexane/EtOAc: 2min at 90/10 then 20min at 60/40) to obtain **6a** (3.256g, 76%) as a colorless oil.

R_f=0.33 (Cyclohexane/EtOAc 6/4).

[α]_D 78 (c 1, CHCl₃). ESI-HRMS m/z [M+Na]⁺ calculated for C₁₆H₂₉N₉NaO₆: 466.2138, found: 466.2144.

¹H NMR (300MHz, CDCl₃) δ 4.71 (d, J=3.6Hz, 1H, H₁), 3.81-3.46 (m, 10H H₃, H₅, CH₂OH, OCH₂(CH₂)₂N₃), 3.38-3.31 (m, 6H, CH₂N₃), 3.33 (s, 3H, CHOCH₃), 3.23-3.17 (m, 2H, H₂, H₄), 1.87-1.73 (m, 6H, CH₂CH₂N₃).

¹³C NMR (75MHz, CDCl₃) δ 97.57(C₁), 81.4 (C₃), 80.8 (C₂), 77.8 (C₄), 70.7 (C₅), 70.0 (OCH₂(CH₂)₂N₃), 69.5 (OCH₂(CH₂)₂N₃), 67.8 (OCH₂(CH₂)₂N₃), 61.7 (CH₂OH), 55.2 (OCH₃), 48.5 (CH₂N₃), 48.3 (CH₂N₃), 48.2 (CH₂N₃), 29.8 (CH₂CH₂N₃), 29.6 (CH₂CH₂N₃), 29.5 (CH₂CH₂N₃).



Chemical Formula: C₂₂H₃₉N₉O₈
Exact Mass: 557.29

Methyl 2,3,4-tri-O-(3-azidopropyl)-6-O-tertbutylacetate- α -D-glucopyranoside

(7a)

To a solution of **6a** (3.747g, 8.454mmol, 1eq) in toluene (84mL), tert-butyl 2-bromoacetate (7.4mL, 50.749mmol, 6eq), TBAB (0.273g, 0.846mmol, 0.1eq) and NaOH_{aq} 50% (28mL, 0.338mol, 40eq) were added. The mixture was vigorously stirred at 80°C for 4h then at room temperature overnight. The residue was diluted in EtOAc (100mL). The organic layer was washed with 1M HCl (3x50mL), a saturated solution of NaHCO₃ (3x50mL), brine (3x50mL), dried (MgSO₄), filtered and concentrated *in vacuo*. The

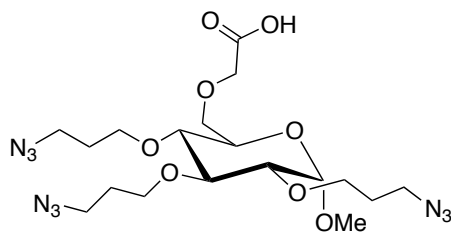
crude product was purified by gel silica chromatography (Cyclohexane/EtOAc: 2min at 100/0 then 20min at 70/30) to obtain **7a** (4,029g, 85%) as a yellowish oil.

R_f=0.38 (Cyclohexane/EtOAc 7/3).

[α]_D 59 (c 1, CHCl₃). ESI-HRMS m/z [M+Na]⁺ calculated for C₂₂H₃₉N₉NaO₈: 580.2819, found: 580.2825.

¹H NMR (300MHz, CDCl₃) δ 4.73 (d, J=3.6Hz, 1H, H₁), 3.98 (s, 1H, CH₂COOC(CH₃)₃), 3.97 (s, 1H, CH₂COOC(CH₃)₃), 3.80-3.46 (m, 10H, H₃, H₅, CH₂OCH₂COOC(CH₃)₃, OCH₂(CH₂)₂N₃), 3.37-3.29 (m, 7H, H₄, CH₂N₃), 3.33 (s, 3H, CHOCH₃), 3.26-3.21 (m, 1H, H₂), 1.83-1.74 (m, 6H, CH₂CH₂N₃), 1.41 (s, 9H, C_qCH₃).

¹³C NMR (75MHz, CDCl₃) δ 169.3 (COOC(CH₃)₃), 97.6 (C₁), 81.6 (C_qCH₃), 81.5 (C₃), 80.6 (C₂), 76.6 (C₄), 70.1 (C₅), 69.9 (OCH₂(CH₂)₂N₃), 69.8 (OCH₂(CH₂)₂N₃), 69.4 (OCH₂(CH₂)₂N₃), 69.2 (OCH₂COOC(CH₃)₃), 67.7 (CH₂OCH₂COOC(CH₃)₃), 55.2 (OCH₃), 48.5 (CH₂N₃), 48.4 (CH₂N₃), 48.2 (CH₂N₃), 29.8 (CH₂CH₂N₃), 29.7 (CH₂CH₂N₃), 29.5 (CH₂CH₂N₃), 28.1 (C_qCH₃).



Chemical Formula: $C_{18}H_{31}N_9O_8$
Exact Mass: 501,23

Methyl 2,3,4-tri-O-(3-azidopropyl)-6-O-carboxymethyl- α -D-glucopyranoside (8a)

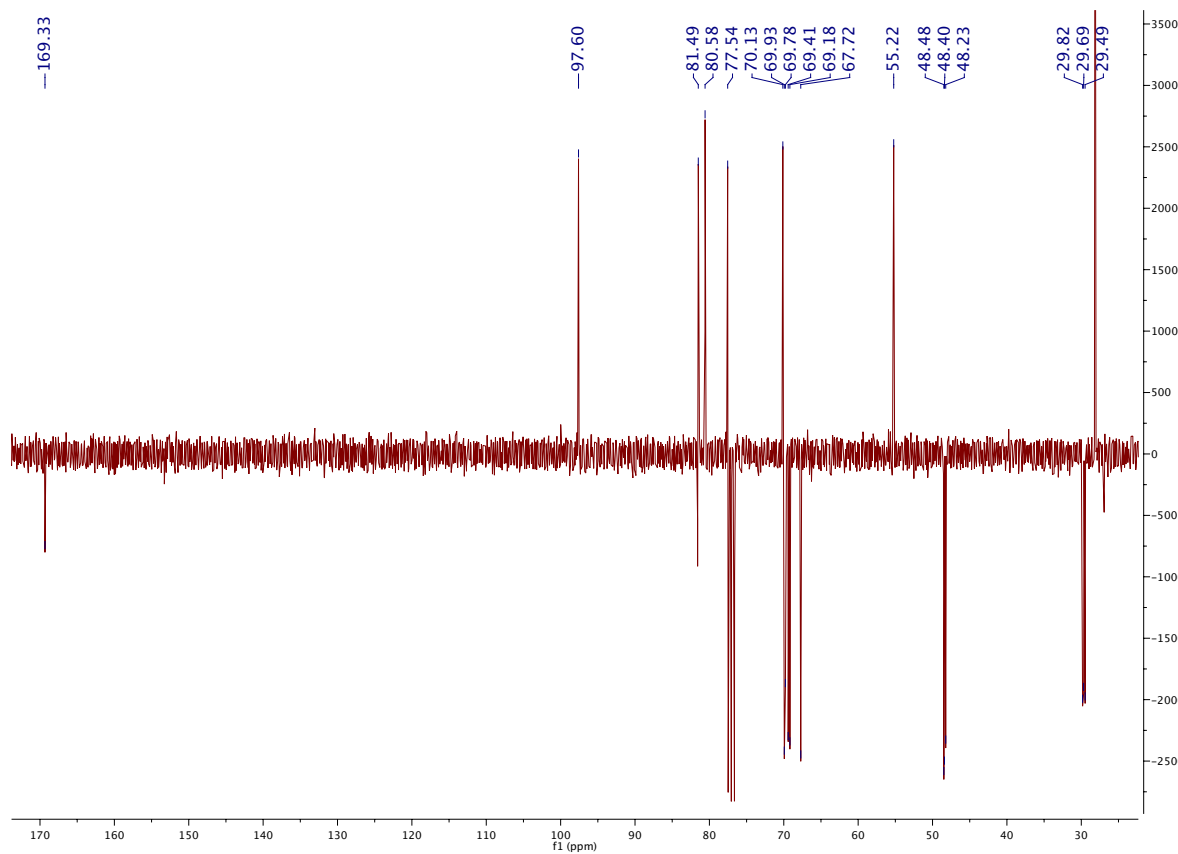
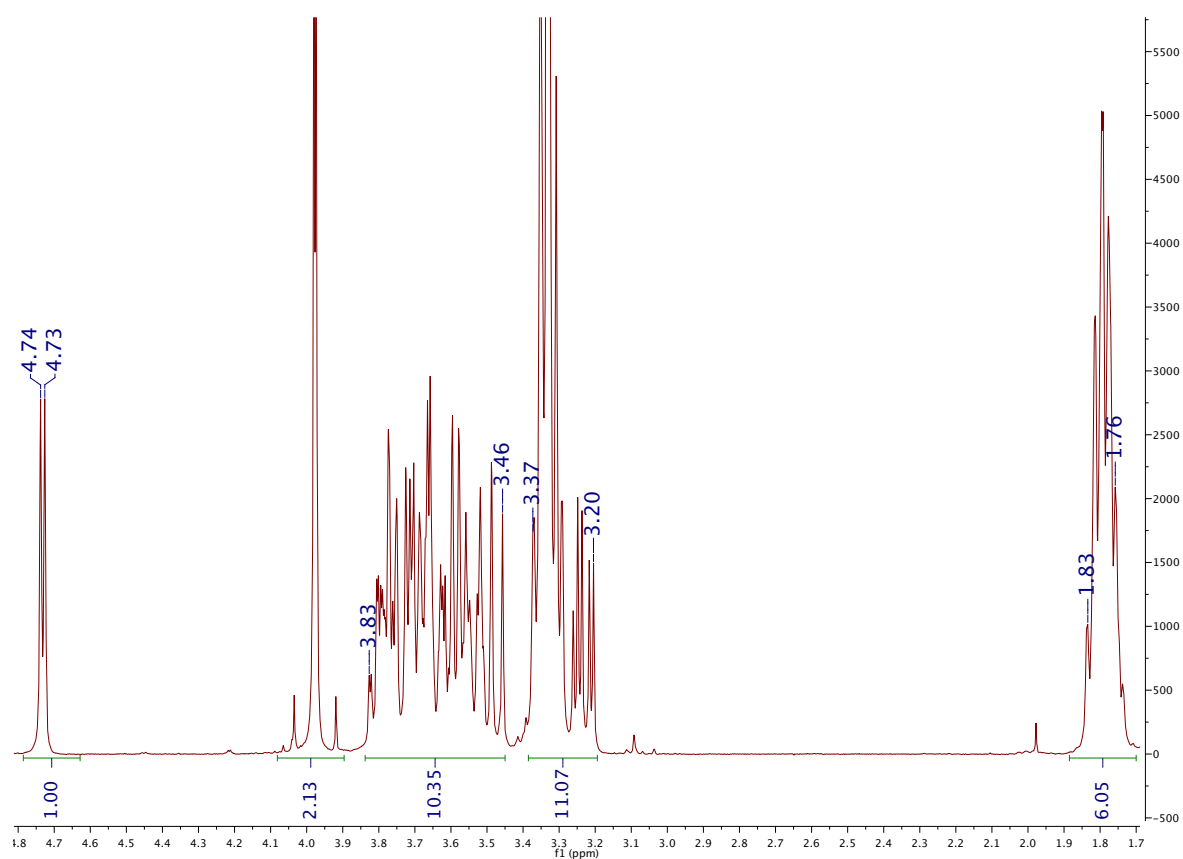
To a solution of **7a** (4.159g, 7.4588mmol, 1eq) in dry DCM (90mL), TFA (90mL) was slowly added. The mixture was stirred for 40minutes at room temperature. The solvents were evaporated. The residue was dissolved in DCM (90mL) and washed with brine until a neutral pH. The organic layer was dried ($MgSO_4$), filtered and concentrated *in vacuo*. The crude product was purified by silica gel chromatography (EtOAc/MeOH: 95/5) to obtain **8a** (3.694g, 99%) as a brown liquid.

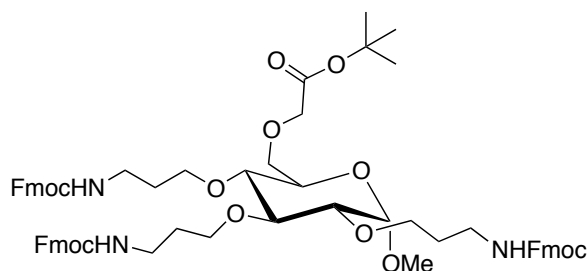
R_f =0.5 (DCM/MeOH 9.5/0.5).

$[\alpha]_D^{62}$ (c 1, $CHCl_3$). ESI-HRMS m/z $[M-H]^-$ calculated for $C_{18}H_{30}N_9O_8$: 500.2217, found: 500.2206.

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 9.99 (s, 1H, COOH), 4.79 (d, J =3.6Hz, 1H, H_1), 3.98-3.97 (m, 2H, CH_2COOH), 3.83-3.46 (m, 10H, H_3 H_4 H_5 , CH_2OCH_2COOH , $OCH_2(CH_2)_2N_3$), 3.37-3.20 (m, 11H, H_2 H_4 , CH_2N_3 , $CHOCH_3$), 1.83-1.76 (m, 6H, $CH_2CH_2N_3$).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 169.3 (COOH), 97.6 (C_1), 81.58 (C_3), 81.5 (C_3), 80.6 (C_2), 77.5 (C_4), 70.1 (C_5), 69.9 ($OCH_2(CH_2)_2N_3$), 69.8 ($OCH_2(CH_2)_2N_3$), 69.4 ($OCH_2(CH_2)_2N_3$), 69.2 (CH_2COOH), 67.7 (CH_2OCH_2COOH), 55.2 (OCH_3), 48.5 (CH_2N_3), 48.4 (CH_2N_3), 48.2 (CH_2N_3), 29.8 ($CH_2CH_2N_3$), 29.7 ($CH_2CH_2N_3$), 29.5 ($CH_2CH_2N_3$).





Chemical Formula: $C_{67}H_{75}N_3O_{14}$
Exact Mass: 1145,52

Methyl 2,3,4-tri-O-(3-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)aminopropoxy)-6-O-tertbutylacetate- α -D-glucopyranoside (9a)

To a solution of **7a** (0.200g, 0.359mmol, 1eq) in THF (4mL), PPh_3 (0.940g, 3.587mmol, 10eq) was added. The mixture was stirred at room temperature for 3h before adding H_2O (2mL). The mixture was stirred again overnight at room temperature.

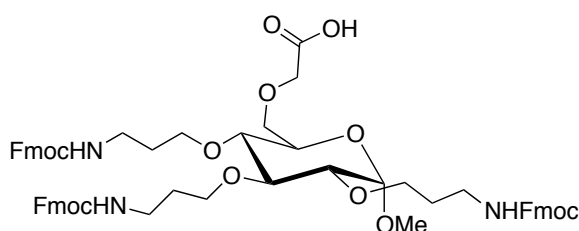
NEt_3 (0.2mL, 1.435mmol, 4eq) then FmocOSu (0.436g, 1.293mmol, 3.6eq) were added. The mixture was stirred at room temperature for 15 minutes. Then, the solution was concentrated *in vacuo*. The residue was dissolved in DCM (100mL), washed with 1M HCl (3x50mL), a saturated solution of $NaHCO_3$ (3x50mL) and with brine (3x50mL). The organic layer was dried ($MgSO_4$), filtered and concentrated *in vacuo*. The crude product was purified by gel silica chromatography (Cyclohexane: 1min at 100% then Toluene/EtOAc/DCM: 10min at 10/60/30) to obtain **9a** as a white solid.

$R_f=0.55$ (Cyclohexane/EtOAc 3/7).

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.66-7.05 (m, 27H, $H_{ar}Fmoc$, NH), 4.73 (d, $J=3.6$ Hz, 1H, H_1), 4.32-4.26 (m, 6H, $NHCOOCH_2$), 4.13-3.83 (m, 3H, $NHCOOCH_2CH$), 4.02 (s, 1H, $OCH_2COOC(CH_3)_3$), 3.95 (s, 1H, $OCH_2COOC(CH_3)_3$), 3.75-3.68 (m, 6H, $OCH_2(CH_2)_2NH$), 3.60-3.43 (m, 4H, H_3 , H_5 , $CH_2OCH_2COOC(CH_3)_3$), 3.33-3.15 (m, 11H, CH_2NH , H_2 , H_4), 3.24 (s, 3H, $CHOCH_3$), 1.74-1.63 (m, 6H, CH_2CH_2NH), 1.38 (s, 9H, CH_3).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 168.5 ($COOC(CH_3)_3$), 155.4 ($NHCOO$), 143.0 (C_qFmoc), 140.3 (C_qFmoc), 128.0 ($C_{ar}Fmoc$), 127.6 ($C_{ar}Fmoc$), 127.4 ($C_{ar}Fmoc$), 127.2 ($C_{ar}Fmoc$), 126.6 ($C_{ar}Fmoc$), 126.0 ($C_{ar}Fmoc$), 124.0 ($C_{ar}Fmoc$), 123.9 ($C_{ar}Fmoc$), 118.9 ($C_{ar}Fmoc$), 96.2 (C_1), 80.8 (C_qCH_3), 80.5 (C_3), 79.0 (C_2), 76.5 (C_4), 70.6 ($OCH_2(CH_2)_2NH$), 69.6

(OCH₂(CH₂)₂NH), 69.1 (C₅), 68.8 (OCH₂(CH₂)₂NH), 68.2 (OCH₂COOC(CH₃)₃), 67.3 (CH₂OCH₂COOC(CH₃)₃), 65.5 (NHCOOCH₂), 65.3 (NHCOOCH₂), 65.2 (NHCOOCH₂), 54.0 (OCH₃), 46.2 (NHCOOCH₂CH), 39.0 (CH₂NH), 38.8 (CH₂NH), 38.6 (CH₂NH), 29.3 (CH₂CH₂NH), 29.2 (CH₂CH₂NH), 28.5 (CH₂CH₂NH).



Chemical Formula: C₆₃H₆₇N₃O₁₄
Exact Mass: 1089,46

Methyl 2,3,4-tri-O-(3-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)aminopropoxy)-6-O-carboxymethyl-α-D-glucopyranoside (10a)

To a solution of **9a** (3.145g, 2.747mmol, 1eq) in DCM (40mL) placed under argon atmosphere, TFA (30mL) was slowly added. The mixture was stirred at room temperature for 30 minutes. The mixture was concentrated *in vacuo*. The residue was dissolved in a minimum of DCM and added to a pre-cooled Et₂O. The solution was placed overnight at 0°C. The product was filtered and concentrated *in vacuo* to obtain **10a** (2.849g, 95%) as a white solid.

R_f=0.63 (EtOAc/MeOH 9/1).

[α]_D 23 (C₁, CHCl₃). ESI-HRMS m/z [M+Na]⁺ calculated for C₆₇H₇₅N₃O₁₄Na: 1168.5147, found: 1168.5095.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.67-7.18 (m, 27H, *H*_{ar}Fmoc, NH), 4.74 (d, J=3.6Hz, 1H, H₁), 4.35-4.28 (m, 6H, NHCOOCH₂), 4.18-3.95 (m, 5H, NHCOOCH₂CH, OCH₂COOH), 3.81-3.39 (m, 10H, OCH₂(CH₂)₂NH, CH₂OCH₂COOH, H₃, H₅), 3.30-3.13 (m, 11H, H₂, H₄, CH₂NH, CHOCH₃), 1.71-1.55 (m, 6H, CH₂CH₂NH).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 143.9 (C_qFmoc), 141.3 (C_qFmoc), 132.3 (C_{ar}Fmoc), 132.1 (C_{ar}Fmoc), 128.9 (C_{ar}Fmoc), 128.7 (C_{ar}Fmoc), 127.7 (C_{ar}Fmoc), 127.1 (C_{ar}Fmoc), 125.0 (C_{ar}Fmoc), 120.0 (C_{ar}Fmoc), 97.3 (C₁), 81.4 (C₃), 79.9 (C₂), 78.2 (C₄), 71.8 (OCH₂(CH₂)₂NH), 71.5 (OCH₂(CH₂)₂NH), 70.0 (C₅), 68.7 (OCH₂(CH₂)₂NH), 68.4

(OCH₂COOH), 68.1 (CH₂OCH₂COOC(CH₃)₃), 66.7 (NHCOOCH₂), 66.5 (NHCOOCH₂), 66.4 (NHCOOCH₂), 55.2 (OCH₃), 47.2 (NHCOOCH₂CH), 38.6 (CH₂NH), 38.6 (CH₂NH), 38.6 (CH₂NH), 30.2 (CH₂CH₂NH), 30.1 (CH₂CH₂NH), 29.6 (CH₂CH₂NH).

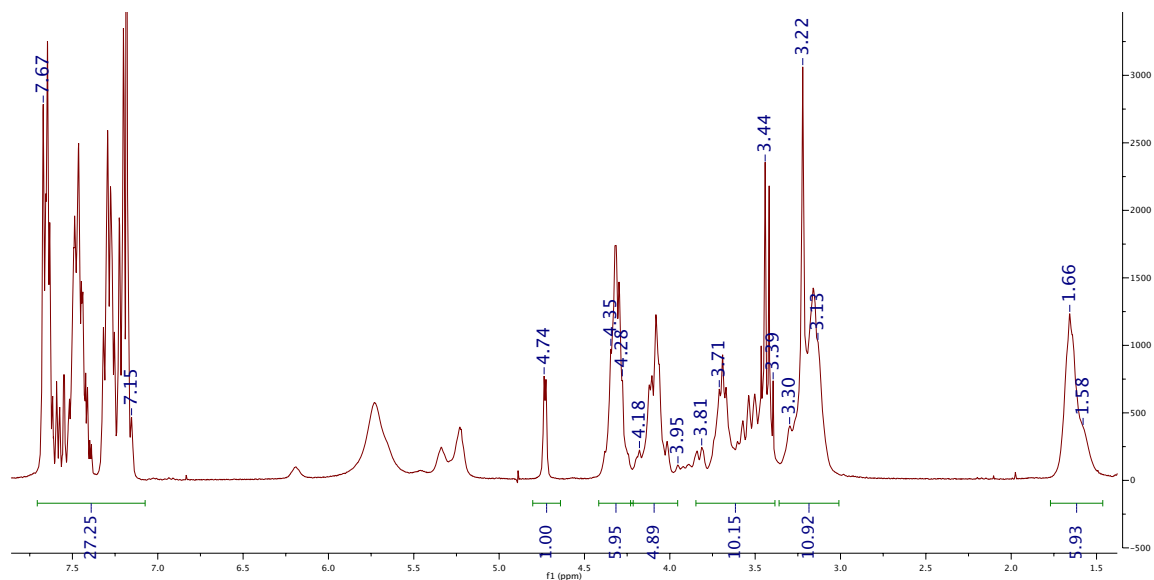


Figure 141 - Spectre RMN ¹H de 10a.

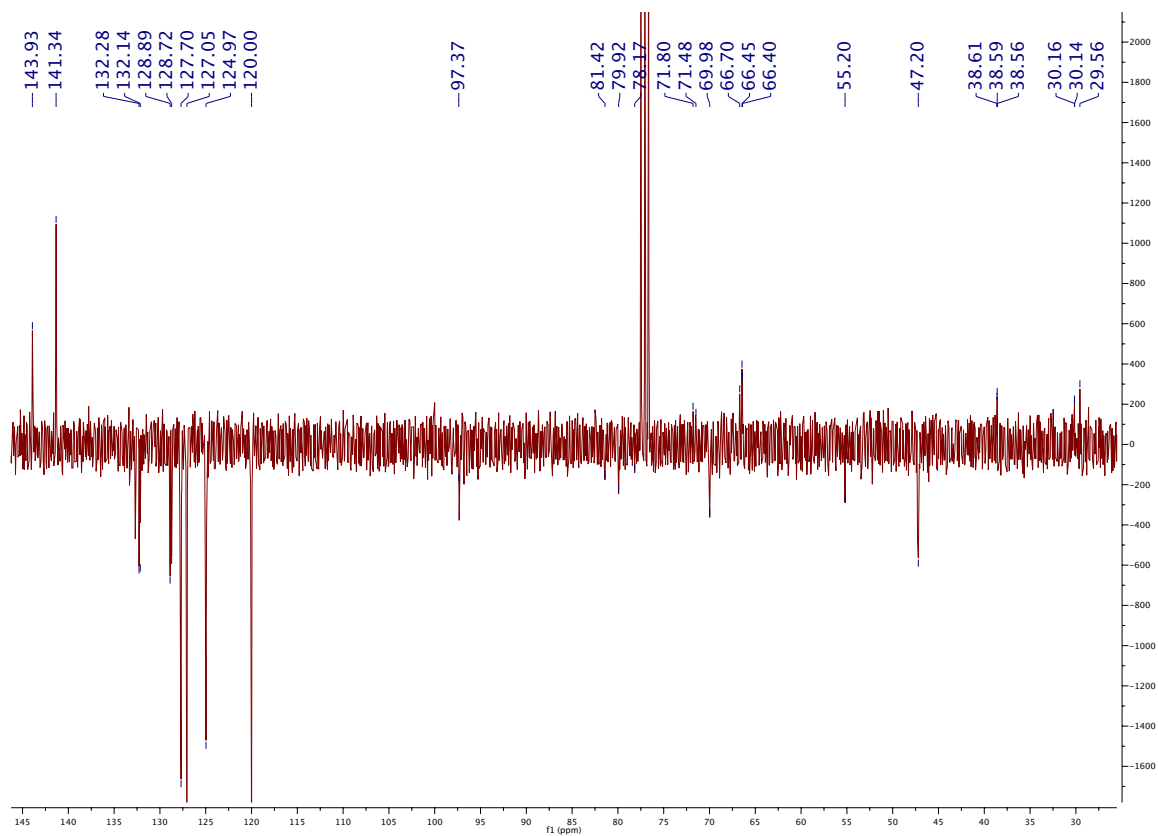
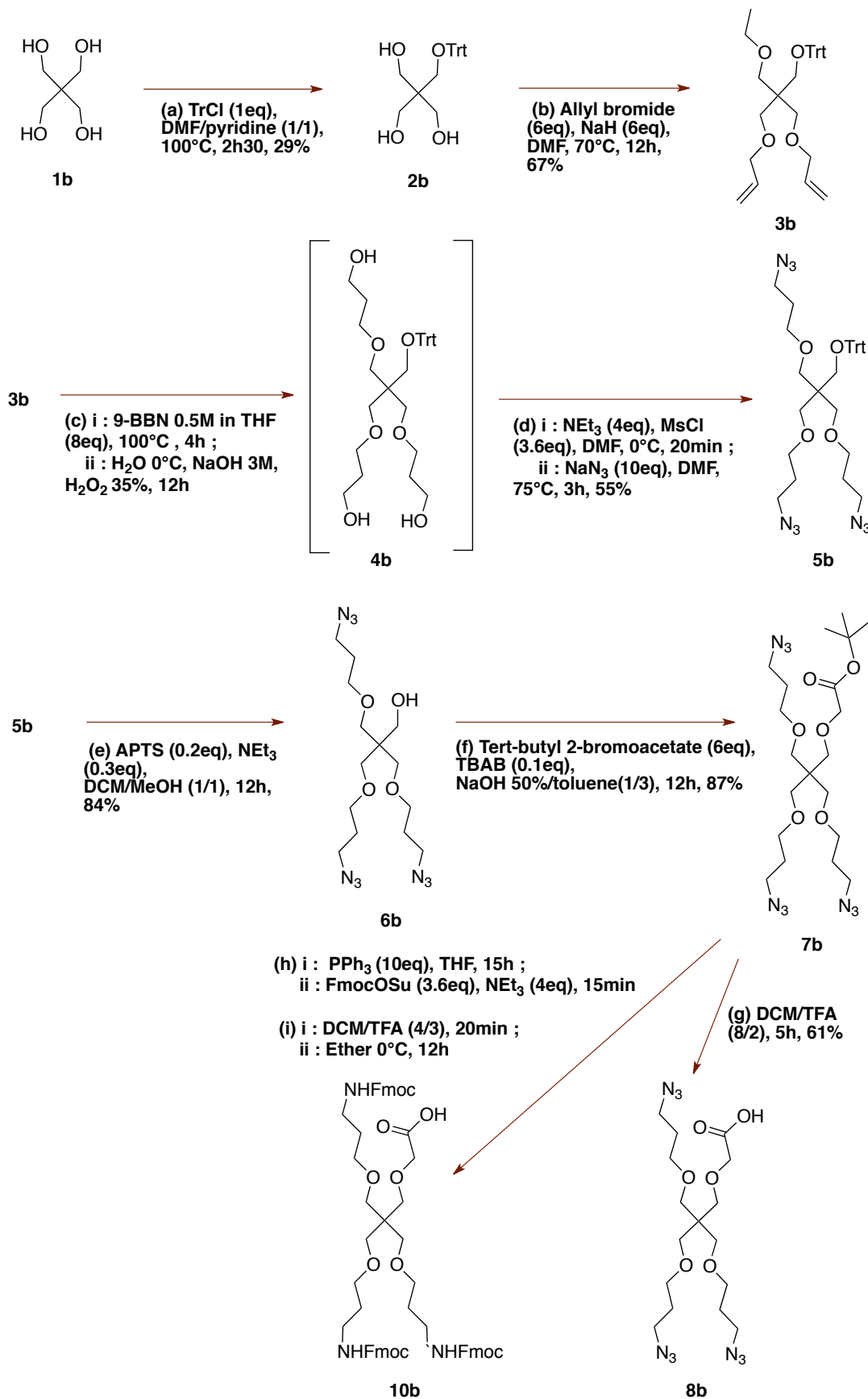
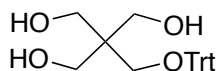


Figure 140 - Spectre RMN ¹³C de 10a.

D. Experimental part: Pentaerythritol





Chemical Formula: $C_{24}H_{26}O_4$
Exact Mass: 378,18

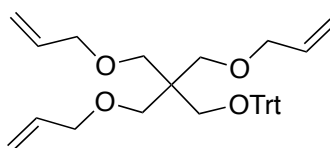
2-hydroxymethyl-2-(triphenyloxymethyl)propane-1,3-diol (2b)

1b (50g, 367mmol, 1eq) was dissolved in DMF/Pyridine (250mL/250mL). Trityl chloride (102.4g, 367mmol, 1eq) and DMAP (8.94g, 73.3mmol, 0.2eq) were added under argon atmosphere. The mixture was stirred at 100°C for 2h30. Then, the solution was concentrated *in vacuo*. The residue was dissolved in Ethyl Acetate (300mL) and washed with 1M HCl (3x100mL), a saturated solution of $NaHCO_3$ (3x100mL) and with brine (3x100mL). The organic layer was dried ($MgSO_4$), filtered and concentrated *in vacuo*. The crude product was recrystallized with toluene to obtain **2b** (40.445g, 29%) as a white solid.

R_f =0.24 (Cyclohexane/EtOAc 2/8).

1H NMR (300MHz, $CDCl_3$) δ 7.34-7.11 (m, 15H, $H_{ar}Trt$), 3.57 (s, 6H, CH_2OH), 3.04(s, 2H, CH_2OTrt), 2.87 (s, 3H, OH).

^{13}C NMR (75MHz, $CDCl_3$) δ 143.6 (C_qTrt), 128.6 ($C_{ar}Trt$), 128.1 ($C_{ar}Trt$), 128.0 ($C_{ar}Trt$), 87.1 (C_qPh_3), 64.5 (CH_2OH), 64.2 (CH_2OTrt), 45.4 (C_qCH_2O).



Chemical Formula: $C_{33}H_{38}O_4$
Exact Mass: 498,28

3-allyloxy-2,2-bis-allyloxymethyl-propoxytriphenylmethane (3b)

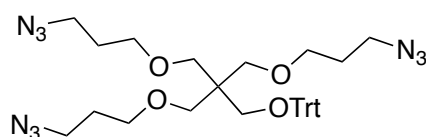
To a solution of **2b** (30g, 79.27mmol, 1eq) in DMF (300mL) placed under argon atmosphere, Allyl bromide (41mL, 475.62mmol, 6eq) was added. Then, NaH 60% (19g, 475.62mmol, 6eq) was slowly added. The mixture was stirred overnight at 70°C. MeOH (200mL) was added. Then, the mixture was concentrated *in vacuo*. The residue was dissolved in DCM (200mL) and washed with brine (3x100mL). The organic layer was

dried (MgSO_4), filtered and concentrated *in vacuo*. The crude product was purified by silica gel chromatography (Cyclohexane/EtOAc: 5min at 100/0 then 30min at 99/1) to obtain **3b** (26.46g, 67%) as a colorless oil.

$R_f=0.45$ (Cyclohexane/EtOAc 9.5/0.5).

^1H NMR (300MHz, CDCl_3) δ 7.38-7.10 (m, 15H, $H_{ar}\text{Trt}$), 5.81-5.68 (m, 3H, $\text{OCH}_2\text{CHCH}_2$), 5.14-5.00 (m, 6H, $\text{OCH}_2\text{CHCH}_2$), 3.83-3.81 (dt, $J=5.3\text{Hz}$, 1.7Hz , 6H, $\text{OCH}_2\text{CHCH}_2$), 3.57 (s, 6H, $\text{C}_q\text{CH}_2\text{O}$), 3.07 (s, 2H, CH_2OTrt),

^{13}C NMR (75MHz, CDCl_3) δ 144.4 (C_qTrt), 135.3 ($\text{OCH}_2\text{CHCH}_2$), 128.9 (C_{ar}Trt), 128.8 (C_{ar}Trt), 128.7 (C_{ar}Trt), 116.0 ($\text{OCH}_2\text{CHCH}_2$), 86.1 (C_qPh_3), 71.1 ($\text{OCH}_2\text{CHCH}_2$), 69.3 ($\text{C}_q\text{CH}_2\text{O}$), 61.6 (CH_2OTrt), 45.7 ($\text{C}_q\text{CH}_2\text{OTrt}$).



Chemical Formula: $\text{C}_{33}\text{H}_{41}\text{N}_9\text{O}_4$
Exact Mass: 627,33

3-(3-azidopropoxy)-2,2-bis-(3-azidopropoxymethyl)-propoxytriphenylmethane (5b)

9-BBN 0.5M in THF (109mL, mmol, 8eq) was added to **3b** (3.404g, 6.826mmol, 1eq) under argon atmosphere. The mixture was stirred at 100°C for 4h. Then, the reaction was cooled down at 0°C , H_2O at 0°C (50mL), 3M NaOH (90mL) and H_2O_2 35% (90mL) were slowly added. The mixture was stirred overnight at room temperature. The solution was diluted with DCM (200mL), washed with a saturated solution of $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (3x75mL) and with brine (3x75mL). The organic layer was dried (MgSO_4), filtered and concentrated *in vacuo*.

The crude product was dissolved under argon atmosphere in DMF (20mL) and cooled down at 0°C . NEt_3 (4.3mL, 30.712mmol, 4eq) and MsCl (2.2mL, 27.306mmol, 3.6eq) were slowly added. The mixture was stirred at 0°C for 20min.

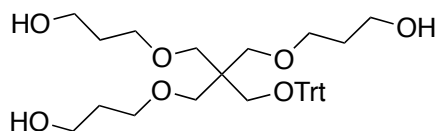
NaN_3 (4.03g, 68.264mmol, 10eq), DMF (3mL) and few drops of water were added. The mixture was stirred at 75°C for 3h. Then, the solution was concentrated *in vacuo*. The residue was dissolved in DCM (100mL) and washed with brine (3x25mL). The

organic layer was dried (MgSO_4), filtered and concentrated *in vacuo*. The crude product was purified by silica gel chromatography (Cyclohexane/EtOAc: 3min at 100/0 then 12min at 90/10) to obtain **5b** (2.364g, 55%) as a colorless oil.

$R_f=0.51$ (Cyclohexane/EtOAc 9/1).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.36-7.14 (m, 15H, $H_{ar}\text{Trt}$), 3.35 (t, $J=6\text{Hz}$, 6H, $\text{OCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{N}_3$), 3.35 (s, 6H, $\text{C}_q\text{CH}_2\text{O}$), 3.18 (t, $J=6.9\text{Hz}$, 6H, CH_2N_3), 3.02 (s, 2H, CH_2OTrt), 1.69 (q, $J=6.3\text{Hz}$, 6H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 144.2 (C_qTrt), 128.8 (C_{ar}Trt), 127.66 (C_{ar}Trt), 126.9 (C_{ar}Trt), 86.2 (C_qPh_3), 69.7 ($\text{C}_q\text{CH}_2\text{O}$), 67.9 ($\text{OCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{N}_3$), 61.5 (CH_2OTrt), 48.5 (CH_2N_3), 45.6 ($\text{C}_q\text{CH}_2\text{OTrt}$), 29.2 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$).

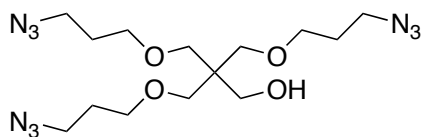


Chemical Formula: $\text{C}_{33}\text{H}_{44}\text{O}_7$
Exact Mass: 552,31

3-(3-hydroxypropoxy)-2,2(3-hydroxypropoxymethyl)-propoxytriphenylmethane (4b)

^1H NMR (300MHz, CDCl_3) δ 7.36-7.16 (m, 15H, $H_{ar}\text{Trt}$), 3.62-3.58 (t, $J=5.5\text{Hz}$, 6H, CH_2OH), 3.48-3.44 (t, $J=5.5\text{Hz}$, 6H, $\text{OCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{OH}$), 3.35 (s, 6H, $\text{C}_q\text{CH}_2\text{O}$), 2.99 (s, 2H, CH_2OTrt), 1.82-1.46 (m, 6H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$).

^{13}C NMR (75MHz, CDCl_3) δ 144.0 (C_qTrt), 128.7 (C_{ar}Trt), 127.7 (C_{ar}Trt), 127.0 (C_{ar}Trt), 86.3 (C_qPh_3), 70.6 ($\text{C}_q\text{CH}_2\text{O}$), 70.3 ($\text{OCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{OH}$), 61.4 (CH_2OTrt), 45.1 ($\text{C}_q\text{CH}_2\text{OTrt}$), 36.4 (CH_2OH), 31.8 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$).



Chemical Formula: $C_{14}H_{27}N_9O_4$
Exact Mass: 385,22

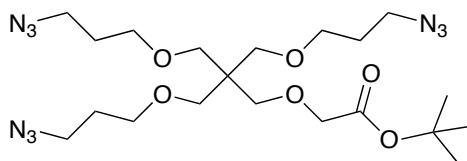
3-(3-azidopropoxy)-2,2-bis-(3-azidopropoxymethyl)-propane-1-ol (6b)

To a solution of **5b** (4.30g, 6.854mmol, 1eq) in DCM/MeOH (30mL/30mL), APTS (522mg, 2.742mmol, 0.4eq) was added. The mixture was stirred overnight at room temperature. NEt_3 (0.48mL, 3.427mmol, 0.5eq) was added. Then, the solution was concentrated *in vacuo*. The residue was dissolved in DCM (50mL) and washed brine (3x20mL). The organic layer was dried ($MgSO_4$), filtered and concentrated *in vacuo*. The crude product was purified by silica gel chromatography (Cyclohexane/EtOAc: 2min at 90/10, 10min at 85/15 then 10min at 70/30) to obtain **6b** (2.148g, 81%) as a yellowish oil.

R_f =0.26(Cyclohexane/EtOAc 9/1)

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 3.62 (s, 2H, CH_2OH), 3.43 (t, J =6Hz, 6H, $OCH_2(CH_2)_2N_3$), 3.38 (s, 6H, C_qCH_2O), 3.30 (t, J =6.9Hz, 6H, CH_2N_3), 1.77 (q, J =6.3Hz, 6H, $CH_2CH_2N_3$).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 71.3 (C_qCH_2O), 68.2 ($OCH_2(CH_2)_2N_3$), 65.8 (CH_2OH), 48.5 (CH_2N_3), 44.9 (C_qCH_2OTrt), 29.0 ($CH_2CH_2N_3$).



Chemical Formula: $C_{20}H_{37}N_9O_6$
Exact Mass: 499,29

3-(3-azidopropoxy)-2,2-bis-(3-azidopropoxymethyl)-propoxytertbutylacetate (7b)

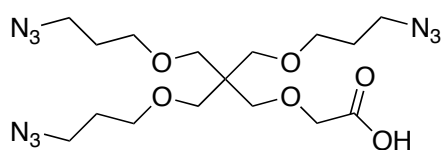
To a solution of **6b** (4.025g, 10.443mmol, 1eq) in toluene (99mL), tert-butyl 2-bromoacetate (9.2mL, 62.659mmol, 6eq), TBAB (337mg, 1.044mmol, 0.1eq) and $NaOH_{aq}$ 50% (33mL) were added. The mixture was vigorously stirred overnight at room

temperature. The crude product was diluted in EtOAc (100mL), washed with 1M HCl (3x50mL), a saturated solution of NaHCO₃ (3x50mL) and with brine (3x50mL). The organic layer was dried (MgSO₄), filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by gel silica chromatography (Cyclohexane/EtOAc: 4min at 100/0, 20min at 90/10 then 10min at 80/20) to obtain **7b** (4.529g, 87%) as a colorless oil.

R_f=0.72 (Cyclohexane/EtOAc 7/3).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 4.03 (s, 2H, OCH₂COOC(CH₃)₃), 3.85 (s, 2H, C_qCH₂OCH₂COO), 3.41 (t, J=6Hz, 6H, OCH₂(CH₂)₂N₃), 3.35 (s, 6H, C_qCH₂O), 3.30 (t, J=6.6Hz, 6H, CH₂N₃), 1.76 (qt, J=6.3Hz, 6H, CH₂CH₂N₃), 1.41 (s, 9H, CH₃).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 168.7 (COOC(CH₃)₃), 80.3 (C(CH₃)₃), 69.8 (C_qCH₂O), 68.6 (OCH₂(CH₂)₂N₃), 68.5 (CH₂COO), 67.5 (CH₂OCH₂COO), 66.8 (OCH₂(CH₂)₂N₃), 47.5 (CH₂N₃), 44.4 (C_qCH₂OCH₂COO), 28.0 (CH₂CH₂N₃), 27.1 (CH₃).



Chemical Formula: C₁₆H₂₉N₉O₆
Exact Mass: 443,22

1-(carboxymethoxy)-3-(3-azidopropoxy)-2,2-bis-(3-azidopropoxymethyl)propane (8b)

To a solution of **7b** (254.3mg, 0.509mmol, 1eq) in DCM (8mL), TFA (2mL) was slowly added. The mixture was stirred for 5h at room temperature. Then, the solution was concentrated *in vacuo*. The crude product was purified by silica gel chromatography (EtOAc/MeOH: 95/5) to give **8b** (137.9mg, 61%) as a yellowish liquid.

R_f=0.25 (DCM/MeOH 9.8/0.2).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 4.00 (s, 2H, C_qCH₂OCH₂COO), 3.47-3.43 (m, 8H, CH₂COOH, OCH₂(CH₂)₂N₃), 3.38 (s, 6H, C_qCH₂O), 3.30 (t, J=6.6Hz, 6H, CH₂N₃), 1.76 (qt, J=6.3Hz, 6H, CH₂CH₂N₃).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 172.7 (COOH), 72.6 (OCH_2COO), 70.5 ($\text{C}_q\text{CH}_2\text{O}$), 68.4 ($\text{OCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{N}_3$), 48.4 (CH_2N_3), 45.0 ($\text{C}_q\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{COO}$), 28.8 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$).

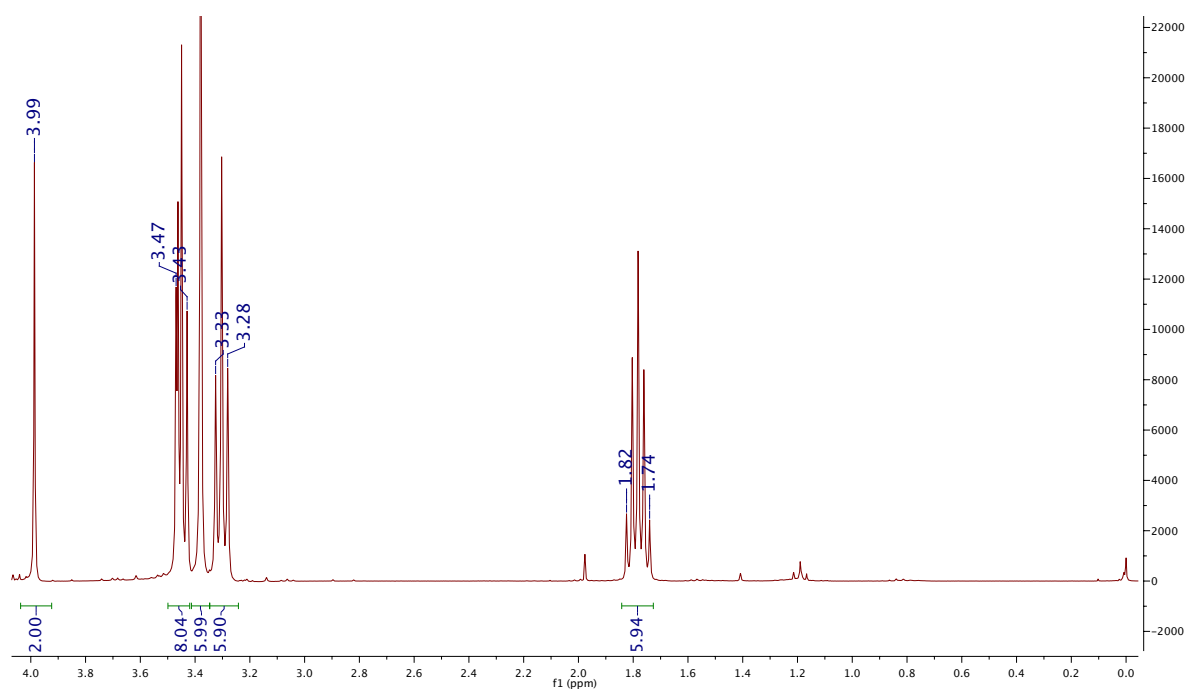


Figure 143 - Spectre RMN ^1H de 8b.

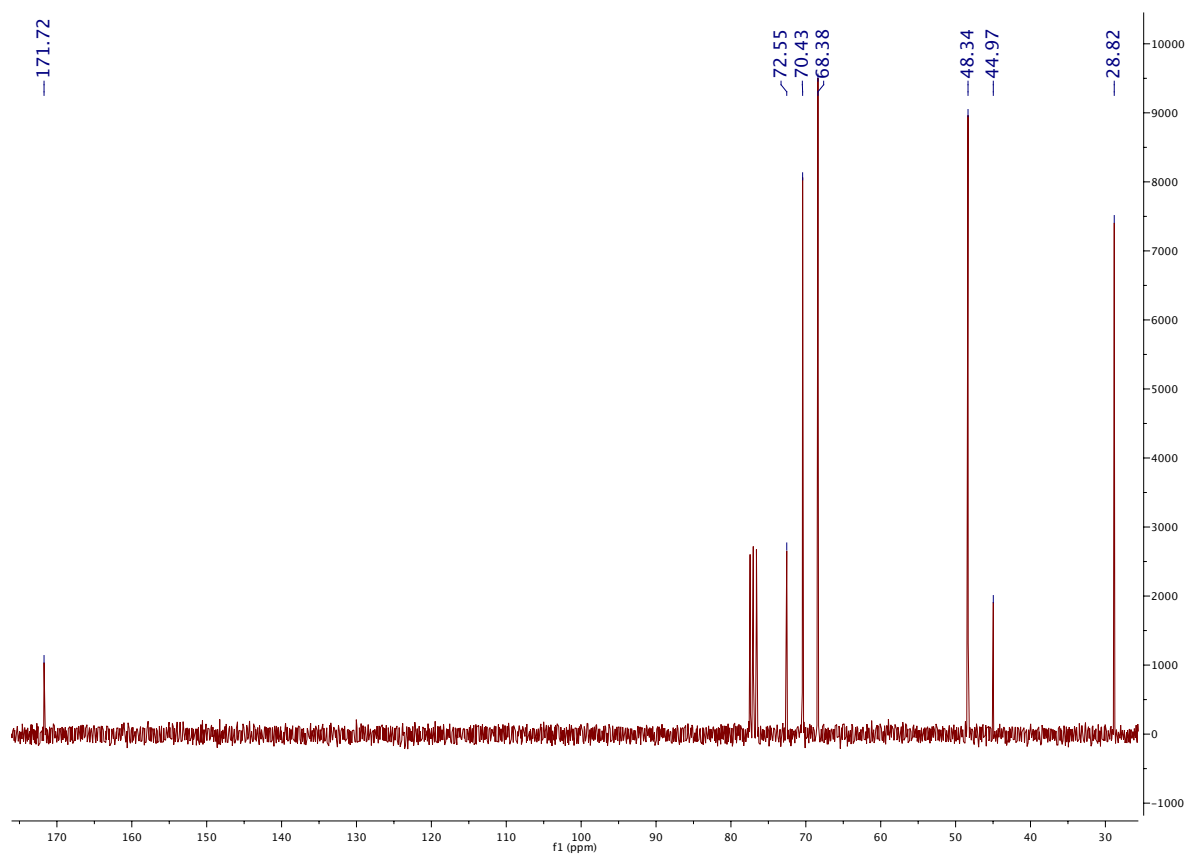
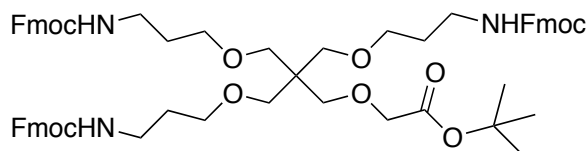


Figure 142 - Spectre RMN ^{13}C de 8b.



Chemical Formula: $C_{65}H_{73}N_3O_{12}$
Exact Mass: 1087,52

3-((9-Fluorenylmethoxycarbonyl)aminopropoxy)-2,2-bis-((9-Fluorenylmethoxycarbonyl)aminopropoxy)-propoxytertbutylacetate (9b)

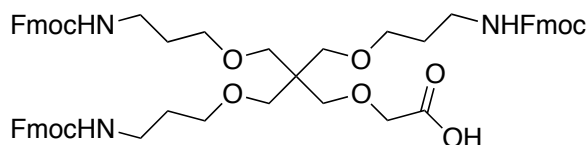
To a solution of **7a** in THF, PPh_3 (10eq) was added. The mixture was stirred at room temperature for 3 hours before adding water (2mL). The mixture was stirred again overnight at room temperature.

NEt_3 (4eq) then FmocOSu (3.6eq) were added. The mixture was stirred for 15minutes at room temperature. Then the solution was concentrated *in vacuo*. The residue was dissolved in EtOAc (100mL), washed with 1M HCl (3x50mL), a saturated solution of $NaHCO_3$ (3x50mL) and with brine (3x50mL). The organic layer was dried ($MgSO_4$), filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was partially purified by gel silica chromatography (Cyclohexane/EtOAc: 20min at 65/35 then 20min at 60/40) to give **9b** as a brownish solid.

$R_f=0.44$ (Cyclohexane/EtOAc 5/5).

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.77-7.27 (m, 24H, $H_{ar}Fmoc$), 5.70 (br, 1H, NH), 5.60 (br, 1H, NH), 5.48 (br, 1H, NH), 4.43 (d, $J=6.6Hz$, 6H, $NHCOOCH_2$), 4.23-4.11 (m, 3H, $NHCOOCH_2CH$), 3.95 (s, 2H, $CH_2OCH_2COOC(CH_3)_3$), 3.52-3.30 (m, 20H, $OCH_2(CH_2)_2NH$, C_qCH_2O , CH_2NH , $OCH_2COOC(CH_3)_3$), 1.80-1.69 (m, 6H, CH_2CH_2NH), 1.48(s, 9H, CH_3).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 169.8 ($COOC(CH_3)_3$), 156.5 (NHCO), 144.1 (C_qFmoc), 141.3 (C_qFmoc), 127.7 ($C_{ar}Fmoc$), 127.0 ($C_{ar}Fmoc$), 125.1 ($C_{ar}Fmoc$), 120.0 ($C_{ar}Fmoc$), 81.4 ($C(CH_3)_3$), 71.0 ($OCH_2COOC(CH_3)_3$), 69.9-69.7 ($OCH_2(CH_2)_2NH$, C_qCH_2O), 69.2 ($CH_2OCH_2COOC(CH_3)_3$), 66.3 ($NHCOOCH_2$), 47.4 ($NHCOOCH_2CH$), 45.2 ($C_qCH_2OCH_2COOC(CH_3)_3$), 39.2 (CH_2NH), 29.4 (CH_2CH_2NH), 28.2 (CH_3).



Chemical Formula: $C_{61}H_{65}N_3O_{12}$
Exact Mass: 1031,46

1-(carboxymethoxy)-3-((9-Fluorenylmethoxycarbonyl)aminopropoxy)-2,2-bis-(3-((9-Fluorenylmethoxycarbonyl)aminopropoxy)-propane(10b)

To a solution of **9b** (1.552g, 1.427mmol, 1eq) in DCM (19mL), TFA (14mL) was slowly added. The mixture was stirred at room temperature for 1h30. Then, the solution was concentrated *in vacuo*. The residue was dissolved in a minimum of DCM and added to pre-cooled Et₂O. The solution was placed at 0°C overnight. The product was filtered and concentrated *in vacuo* to obtain **10b** (487mg, 33%) as a brownish solid.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.77-7.27 (m, 27H, *H*_{ar}Fmoc, NH), 4.42 (d, J=6.6Hz, 6H, NHCOOCH₂), 4.24-4.16 (m, 3H, NHCOOCH₂CH), 4.01 (s, 2H, CH₂OCH₂COOH), 3.54-3.25 (m, 20H, OCH₂(CH₂)₂NH, C_qCH₂O, CH₂NH, OCH₂COOH), 1.72 (m, 6H, CH₂CH₂NH).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 171.9 (COOH), 156.5 (NHCO), 143.9 (C_qFmoc), 141.3 (C_qFmoc), 132.2 (C_{ar}Fmoc), 132.0 (C_{ar}Fmoc), 128.6 (C_{ar}Fmoc), 128.5 (C_{ar}Fmoc), 127.7 (C_{ar}Fmoc), 127.0 (C_{ar}Fmoc), 124.9 (C_{ar}Fmoc), 120.0 (C_{ar}Fmoc), 71.7 (OCH₂COOH), 70.0-69.8 (OCH₂(CH₂)₂NH, C_qCH₂O), 68.4 (CH₂OCH₂COOH), 66.4 (NHCOOCH₂), 66.3 (NHCOOCH₂), 66.2 (NHCOOCH₂), 47.2 (NHCOOCH₂CH), 44.7 (C_qCH₂OCH₂COOH), 38.9 (CH₂NH), 29.3 (CH₂CH₂NH).

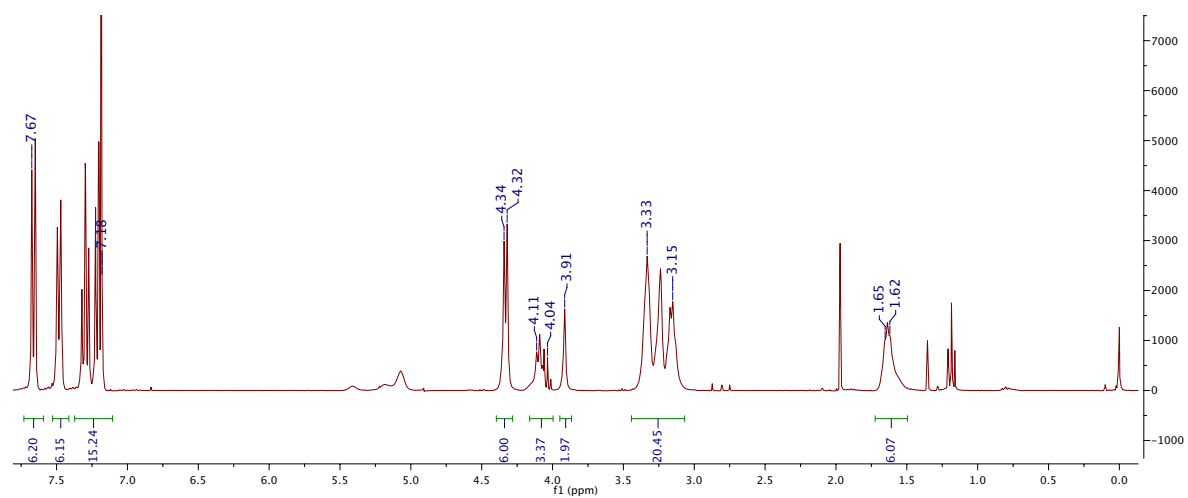


Figure 145 - Spectre RMN ^1H de 10b.

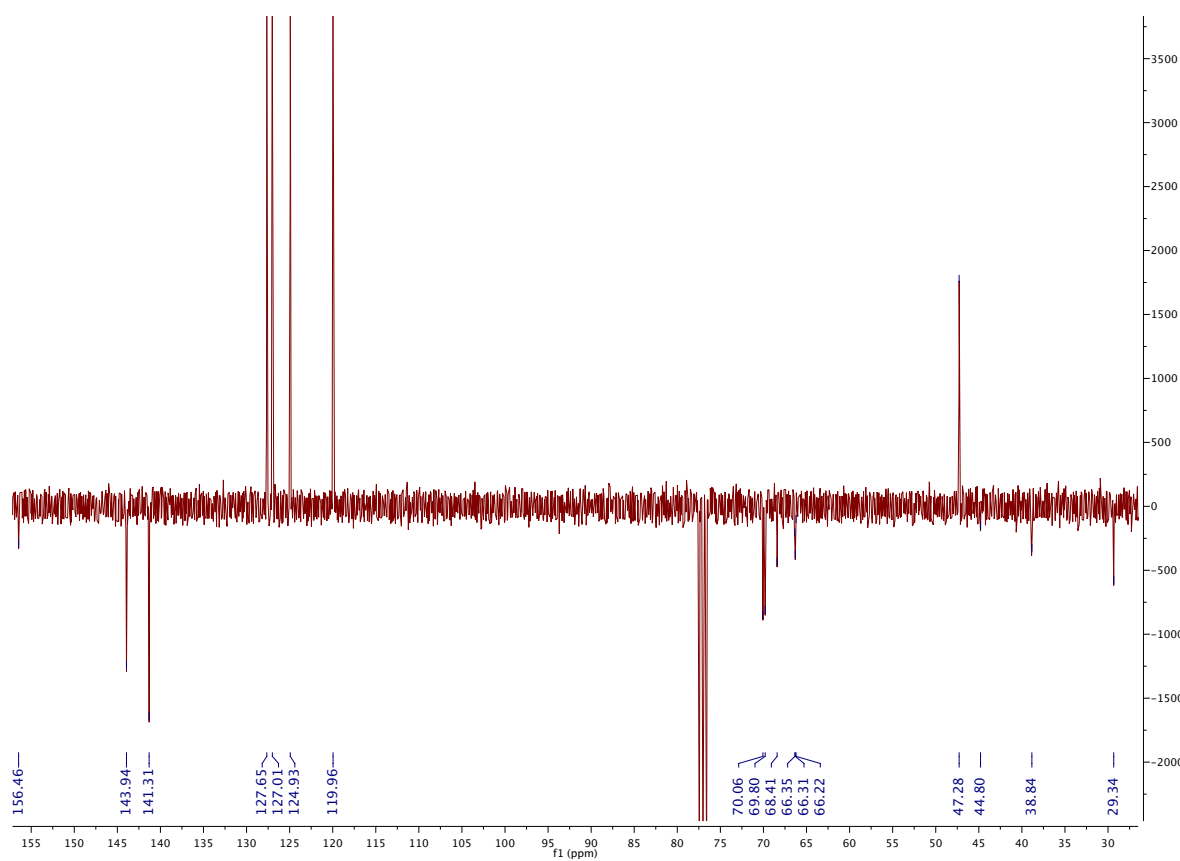
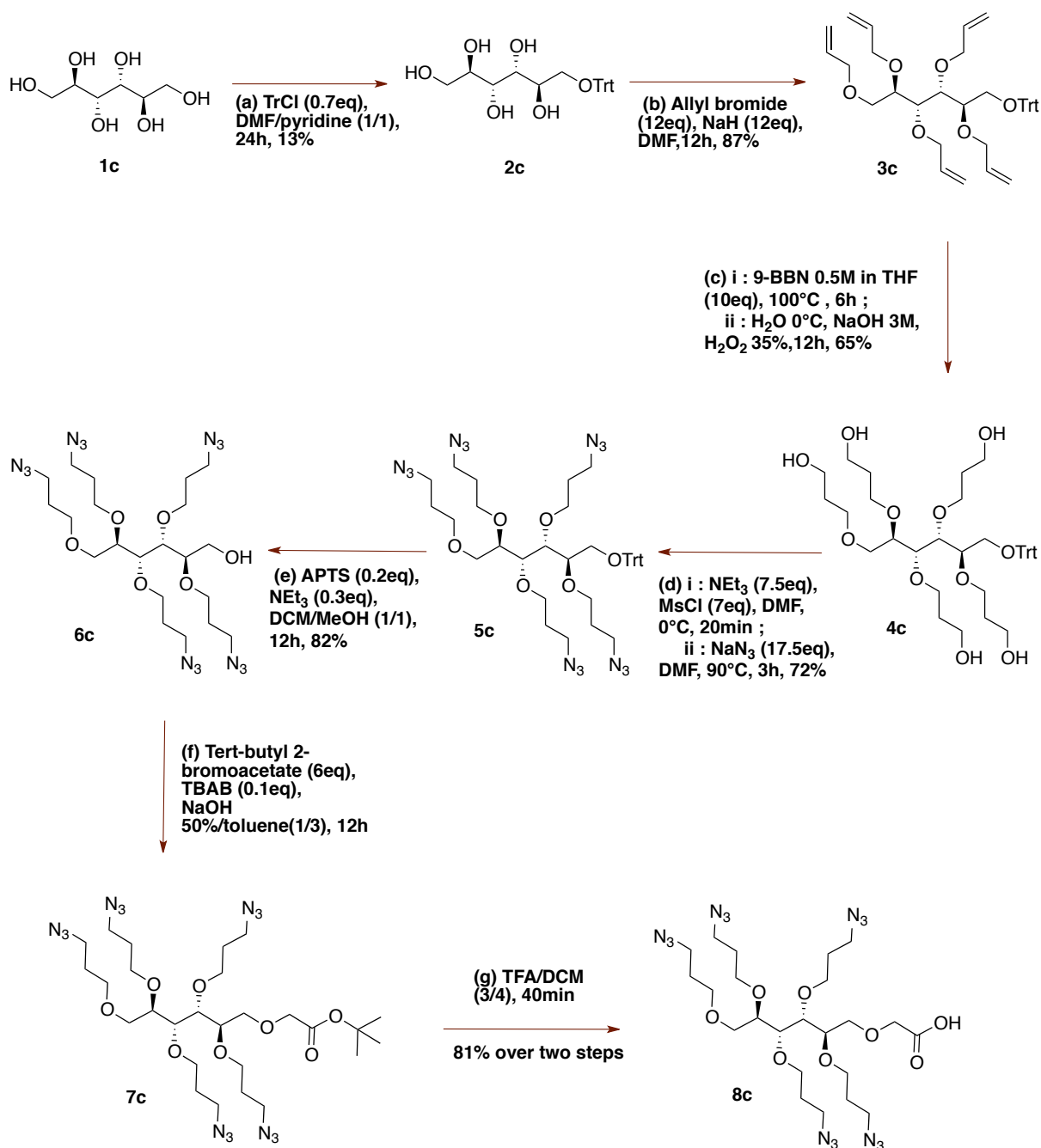
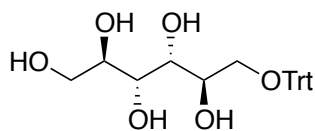


Figure 144 - Spectre RMN ^{13}C de 10b.

E. Experimental part: D-mannitol with 5 branches





Chemical Formula: $C_{25}H_{28}O_6$
Exact Mass: 424,19

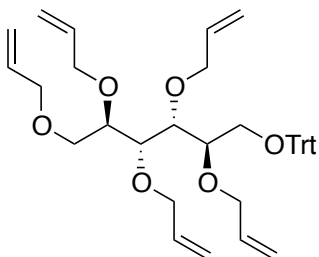
6-O-triphenylmethyl-D-mannitol

1c (10g, 54.894mmol, 1eq) was dissolved in DMF/Pyridine (100mL/100mL). Trityl chloride (10.71g, 38.426mmol, 0.7eq) and a catalytic amount of DMAP were added under argon atmosphere. The mixture was stirred at room temperature for 24h. MeOH (40mL) was added. Then, the solution was concentrated *in vacuo*. The residue was dissolved in DCM (300mL) and washed with 1M HCl (3x100mL), a saturated solution of $NaHCO_3$ (3x100mL) and with brine (3x100mL). The organic layer was dried ($MgSO_4$), filtered and concentrated *in vacuo*. The crude product was purified by silica gel chromatography (Chloroform/MeOH : 90/10) to obtain **2c** as a white solid (2.955g, 13%).

R_f =0.32 (Chloroform/Methanol 9/1).

1H NMR (300MHz, $CDCl_3$) δ 7.41-7.07 (m, 15H, $H_{ar}Trt$), 3.76-3.54 (m, 6H, $CHOH$, CH_2OH), 3.26 (s, 2H, CH_2OTrt).

^{13}C NMR (75MHz, $CDCl_3$) δ 143.7 (C_qTrt), 128.7 ($C_{ar}Trt$), 128.0 ($C_{ar}Trt$), 127.3 ($C_{ar}Trt$), 87.0 (C_qPh_3), 72.3-70.1 ($CHOH$), 65.3-63.8 (CH_2OTrt , CH_2OH).



Chemical Formula: C₄₀H₄₈O₆
Exact Mass: 624,35

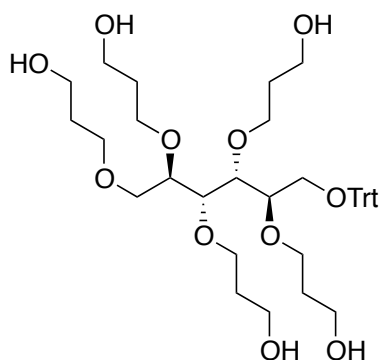
1,2,3,4,5-penta-O-allyl-6-O-triphenylmethyl-D-mannitol (3c)

To a solution of **2c** (1g, 2.356mmol, 1eq) in DMF (10mL) placed under argon atmosphere, Allyl bromide (2.5mL, 28.270mmol, 12eq) was added. Then, NaH 60% (1.13g, 28.270mmol, 12eq) was slowly added. The mixture was stirred overnight at room temperature. MeOH (4mL) was added. Then, the solution was concentrated *in vacuo*. The residue was dissolved in DCM (100mL) and washed with brine (3x50mL). The organic layer was dried (MgSO₄), filtered and concentrated *in vacuo*. The crude product was purified by silica gel chromatography (Cyclohexane/EtOAc: 3min at 100/0, 8min at 98/2, 10min at 95/5 then 10min at 90/10) to obtain **3c** (1.279g, 87%) as a colorless oil.

R_f=0.7 (Cyclohexane/EtOAc 8/2).

¹H NMR (300MHz, CDCl₃) δ 7.44-7.12 (m, 15H, *H*_{ar}Trt), 5.98-5.72 (m, 4H, OCH₂CHCH₂), 5.59-5.46 (m, 1H, OCH₂CHCH₂), 5.32-4.83 (m, 10H, OCH₂CHCH₂), 4.23-3.46 (m, 17H, CH₂OTrt, CHOCH₂CHCH₂, CH₂OCH₂CHCH₂, OCH₂CHCH₂), 3.05-3.00 (dd, *J* = 3.9Hz, 10.5Hz, 1H, CH₂OTrt).

¹³C NMR (75MHz, CDCl₃) δ 144.1 (*C*_qTrt), 135.4 (OCH₂CHCH₂), 135.2 (OCH₂CHCH₂), 135.1 (OCH₂CHCH₂), 134.9 (OCH₂CHCH₂), 134.9 (OCH₂CHCH₂), 128.9 (*C*_{ar}Trt), 127.8 (*C*_{ar}Trt), 126.9 (*C*_{ar}Trt), 116.9 (OCH₂CHCH₂), 116.4 (OCH₂CHCH₂), 116.2 (OCH₂CHCH₂), 116.1 (OCH₂CHCH₂), 86.4 (*C*_qPh₃), 78.8 (CHOCH₂CHCH₂), 78.4 (CHOCH₂CHCH₂), 78.1 (CHOCH₂CHCH₂), 78.0 (CHOCH₂CHCH₂), 73.5 (OCH₂CHCH₂), 73.4 (OCH₂CHCH₂), 72.3 (OCH₂CHCH₂), 70.8 (OCH₂CHCH₂), 70.6 (OCH₂CHCH₂), 69.1 (CH₂OCH₂CHCH₂), 61.8 (CH₂OTrt).



Chemical Formula: $C_{40}H_{58}O_{11}$
Exact Mass: 714,40

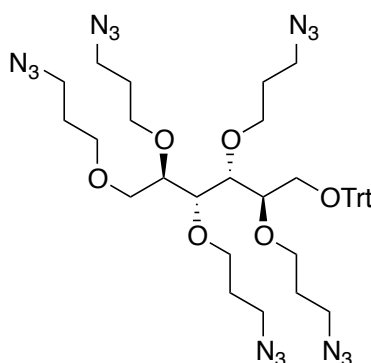
1,2,3,4,5-penta-O-(3-hydroxypropoxy)-6-O-triphenylmethyl-D-mannitol (4c)

9-BBN 0.5M in THF (158mL, 78.90mmol, 10eq) was added to **3c** (4.926g, 7.890mmol, 1eq) under argon atmosphere. The mixture was stirred at 100°C for 6h. Then, the reaction was cooled at 0°C, H₂O at 0°C (150 mL), 3M NaOH (170mL) and H₂O₂ 35% (170mL) were slowly added. The mixture was stirred overnight at room temperature. The solution was diluted with DCM (100mL), washed with a saturated solution of Na₂S₂O₃ (3x50mL) and with brine (3x50mL). The organic layer was dried (MgSO₄), filtered and concentrated *in vacuo*. The crude product was purified by silica gel chromatography (EtOAc /MeOH: 90/10) to obtain the compound **4c** (3.67g, 65%) as a white solid.

R_f=0.18 (EtOAc/MeOH 9/1).

¹H NMR (300MHz, CDCl₃) δ 7.42-7.14 (m, 15H, *H*_{ar}Trt), 3.80-3.40 (m, 28H, CH₂OH, OCH₂(CH₂)₂OH, CHO(CH₂)₃OH, CH₂O(CH₂)₃OH, CH₂Otrt), 1.95-1.65 (m, 8H, CH₂CH₂OH), 1.45-1.38 (m, 2H, CH₂CH₂OH).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 143.9 (*C*_qTrt), 129.7 (*C*_{ar}Trt), 128.8 (*C*_{ar}Trt), 127.8 (*C*_{ar}Trt), 127.1 (*C*_{ar}Trt), 86.6 (*C*_qPh₃), 78.9 (CHO(CH₂)₃OH), 77.9 (CHO(CH₂)₃OH), 77.8 (CHO(CH₂)₃OH), 77.4 (CHO(CH₂)₃OH), 70.8 (OCH₂(CH₂)₂OH), 69.8 (OCH₂(CH₂)₂OH), 68.6 (OCH₂(CH₂)₂OH), 68.0 (OCH₂(CH₂)₂OH), 67.4 (OCH₂(CH₂)₂OH), 66.9 (CH₂O(CH₂)₃OH), 61.5 (CH₂OTrt), 60.9 (CH₂OH), 60.9 (CH₂OH), 60.5 (CH₂OH), 60.3 (CH₂OH), 60.0 (CH₂OH), 32.6 (CH₂CH₂OH), 32.5 (CH₂CH₂OH), 32.3 (CH₂CH₂OH), 32.2 (CH₂CH₂OH), 31.9 (CH₂CH₂OH).



Chemical Formula: $C_{40}H_{53}N_{15}O_6$
Exact Mass: 839,43

1,2,3,4,5-penta-O-(3-azidopropoxy)-6-O-triphenylmethyl-D-mannitol (5c)

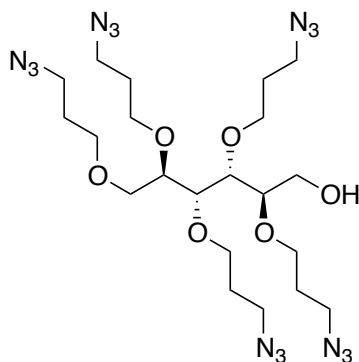
4c (3.65g, 5.109mmol, 1eq) was dissolved under argon atmosphere in DMF (11mL) and cooled down at 0°C. NEt_3 (5.3mL, 38.319mmol, 7.5eq) and $MsCl$ (2.88mL, 35.764mmol, 7eq) were slowly added. The mixture was stirred at 0°C for 20min.

NaN_3 (5.81g, 89.411mmol, 17.5eq), DMF (20mL) and few drops of water were added. The mixture was stirred at 90°C for 3h. Then, the solution was concentrated *in vacuo*. The residue was dissolved in DCM (200mL) and washed with brine (3x100mL). The organic layer was dried ($MgSO_4$), filtered and concentrated *in vacuo*. The crude product was purified by silica gel chromatography (Cyclohexane/EtOAc: 3min at 95/5 then 25min at 90/10) to obtain **5c** (3.084g, 72%) as a colorless oil.

R_f =0.67 (Cyclohexane/EtOAc 8/2).

1H NMR (300MHz, $CDCl_3$) δ 7.41-7.15 (m, 15H, $H_{ar}Trt$), 3.76-2.86 (m, 28H, CH_2N_3 , $OCH_2(CH_2)_2N_3$, $CHO(CH_2)_3N_3$, $CH_2O(CH_2)_3N_3$, CH_2OTrt), 1.95-1.38 (m, 10H, $CH_2CH_2N_3$).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 1439 (C_qTrt), 129.7 ($C_{ar}Trt$), 128.8 ($C_{ar}Trt$), 127.8 ($C_{ar}Trt$), 127.1 ($C_{ar}Trt$), 86.5 (C_qPh_3), 78.8 ($CHO(CH_2)_3N_3$), 78.5 ($CHO(CH_2)_3N_3$), 77.9 ($CHO(CH_2)_3N_3$), 69.2 ($OCH_2(CH_2)_2N_3$), 68.8 ($OCH_2(CH_2)_2N_3$), 68.7 ($OCH_2(CH_2)_2N_3$), 68.0 ($OCH_2(CH_2)_2N_3$), 66.7 ($OCH_2(CH_2)_2N_3$), 65.8 ($CH_2O(CH_2)_3N_3$), 61.6 (CH_2OTrt), 48.5 (CH_2N_3), 48.5 (CH_2N_3), 48.4 (CH_2N_3), 48.3 (CH_2N_3), 48.3 (CH_2N_3), 29.6 ($CH_2CH_2N_3$), 29.6 ($CH_2CH_2N_3$), 29.5 ($CH_2CH_2N_3$), 29.4 ($CH_2CH_2N_3$), 29.2 ($CH_2CH_2N_3$).



Chemical Formula: $C_{21}H_{39}N_{15}O_6$
Exact Mass: 597,32

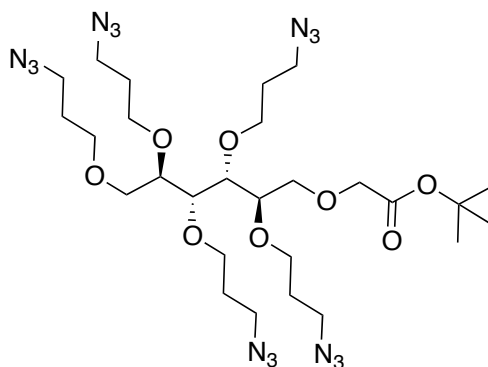
1,2,3,4,5-penta-O-(3-azidopropoxy)-D-mannitol (6c)

To a solution of **5c** (3.064g, 3.640mmol, 1eq) in DCM/MeOH (50mL/50mL), dry APTS (139mg, 0.730mmol, 0.2eq) was added. The mixture was stirred overnight at room temperature. Triethylamine (0.51mL, 1.095mmol, 0.3eq) was added. Then, the solution was concentrated *in vacuo*. The residue was dissolved in DCM (200mL), washed with a saturated solution of $NaHCO_3$ (3x50mL) and brine (3x50mL). The organic layer was dried ($MgSO_4$), filtered and concentrated *in vacuo*. The crude product was purified by silica gel chromatography (Cyclohexane/EtOAc: 10min at 80/20, 10min at 70/30 then 10min at 60/40) to obtain **6c** (1.783g, 82%) as an oil.

R_f =0.35 (Cyclohexane/EtOAc 6/4).

1H NMR (300MHz, $CDCl_3$) δ 3.88-3.31 (m, 28H, $CHO(CH_2)_3N_3$, $CH_2O(CH_2)_3N_3$, $OCH_2(CH_2)_2N_3$, CH_2N_3 , CH_2OH), 1.85-1.73 (m, 10H, $CH_2CH_2N_3$).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 79.5 ($CHO(CH_2)_3N_3$), 78.6 ($CHO(CH_2)_3N_3$), 78.5 ($CHO(CH_2)_3N_3$), 78.2 ($CHO(CH_2)_3N_3$), 69.4 ($OCH_2(CH_2)_2N_3$), 69.1 ($OCH_2(CH_2)_2N_3$), 69.0 ($OCH_2(CH_2)_2N_3$), 68.0 ($OCH_2(CH_2)_2N_3$), 66.0 ($OCH_2(CH_2)_2N_3$), 65.6 ($CH_2O(CH_2)_3N_3$), 59.7 (CH_2OH), 48.5 (CH_2N_3), 48.4 (CH_2N_3), 48.4 (CH_2N_3), 48.4 (CH_2N_3), 48.3 (CH_2N_3), 29.6 ($CH_2CH_2N_3$), 29.6 ($CH_2CH_2N_3$), 29.5 ($CH_2CH_2N_3$), 29.3 ($CH_2CH_2N_3$), 29.2 ($CH_2CH_2N_3$).

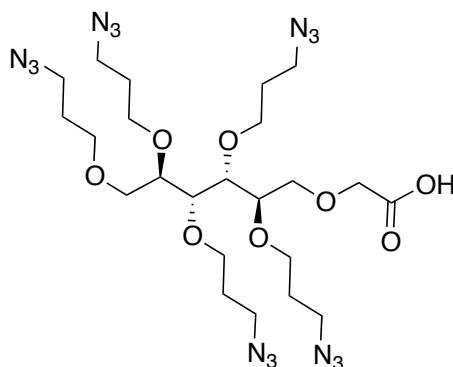


Chemical Formula: $C_{27}H_{49}N_{15}O_8$
Exact Mass: 711,39

1,2,3,4,5-penta-O-(3-azidopropoxy)-6-O- tertbutylacetate-D-mannitol (7c)

To a solution of a **6c** (1.753g, 2.935mmol, 1eq) in toluene (28mL), tert-butyl 2-bromoacetate (2.6mL, 17.609mmol, 6eq), TBAB (95mg, 0.294mmol, 0.1eq) and NaOH_{aq} 50% (9.5mL) were added. The mixture was vigorously stirred overnight at room temperature. The crude product was diluted in ethyl acetate (100mL). The organic layer was washed with 1M HCl (3x50mL), a saturated solution of NaHCO₃ (3x50mL), brine (3x50mL), dried (MgSO₄), filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was partly purified by gel silica chromatography (Cyclohexane/EtOAc: 4min at 100/0, 20min at 90/10 then 10min at 80/20) and used in the next step.

R_f=0.75 (Cyclohexane/EtOAc 6/4).



Chemical Formula: $C_{23}H_{41}N_{15}O_8$
Exact Mass: 655,33

1,2,3,4,5-penta-O-(3-azidopropoxy)-6-O-carboxymethyl-D-mannitol (8c)

The crude **7c** (2.089g, 2.935mmol, 1eq) was dissolved in DCM (40mL). Then, TFA (30mL) was slowly added. The mixture was stirred for 40 minutes at room temperature. Then, the solution was concentrated *in vacuo*. The residue was dissolved in DCM (90mL) and washed with brine until a neutral pH. The organic layer was dried ($MgSO_4$), filtered and concentrated *in vacuo*. The crude product was purified by silica gel chromatography (DCM/MeOH: 95/5) to obtain **8c** (959.7mg, 50%).

R_f =0.27 (Cyclohexane/EtOAc 6/4).

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 4.12-4.05 (m, 2H, CH_2COOH), 3.86-3.81 (m, 2H, $CH_2O(CH_2)_3N_3$, CH_2OCH_2COOH), 3.70-3.48 (m, 16H, $CHO(CH_2)_3N_3$, $OCH_2(CH_2)_2N_3$, $CH_2O(CH_2)_3N_3$, CH_2OCH_2COOH), 3.38-3.32 (m, 10H, CH_2N_3), 1.82-1.75 (m, 10H, $CH_2CH_2N_3$).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 128.1 (CH_2COOH), 79.0 ($CHO(CH_2)_3N_3$), 78.6 ($CHO(CH_2)_3N_3$), 78.4 ($CHO(CH_2)_3N_3$), 78.2 ($CHO(CH_2)_3N_3$), 69.8 ($CH_2O(CH_2)_3N_3$), 69.4 ($OCH_2(CH_2)_2N_3$), 69.1 (CH_2OCH_2COOH), 68.4 ($OCH_2(CH_2)_2N_3$), 68.1 ($OCH_2(CH_2)_2N_3$), 66.4 ($OCH_2(CH_2)_2N_3$), 66.0 ($OCH_2(CH_2)_2N_3$), 48.4 (CH_2N_3), 48.3 (CH_2N_3), 48.3 (CH_2N_3), 48.2 (CH_2N_3), 48.2 (CH_2N_3), 29.5 ($CH_2CH_2N_3$), 29.5 ($CH_2CH_2N_3$), 29.4 ($CH_2CH_2N_3$), 29.2 ($CH_2CH_2N_3$), 29.1 ($CH_2CH_2N_3$).

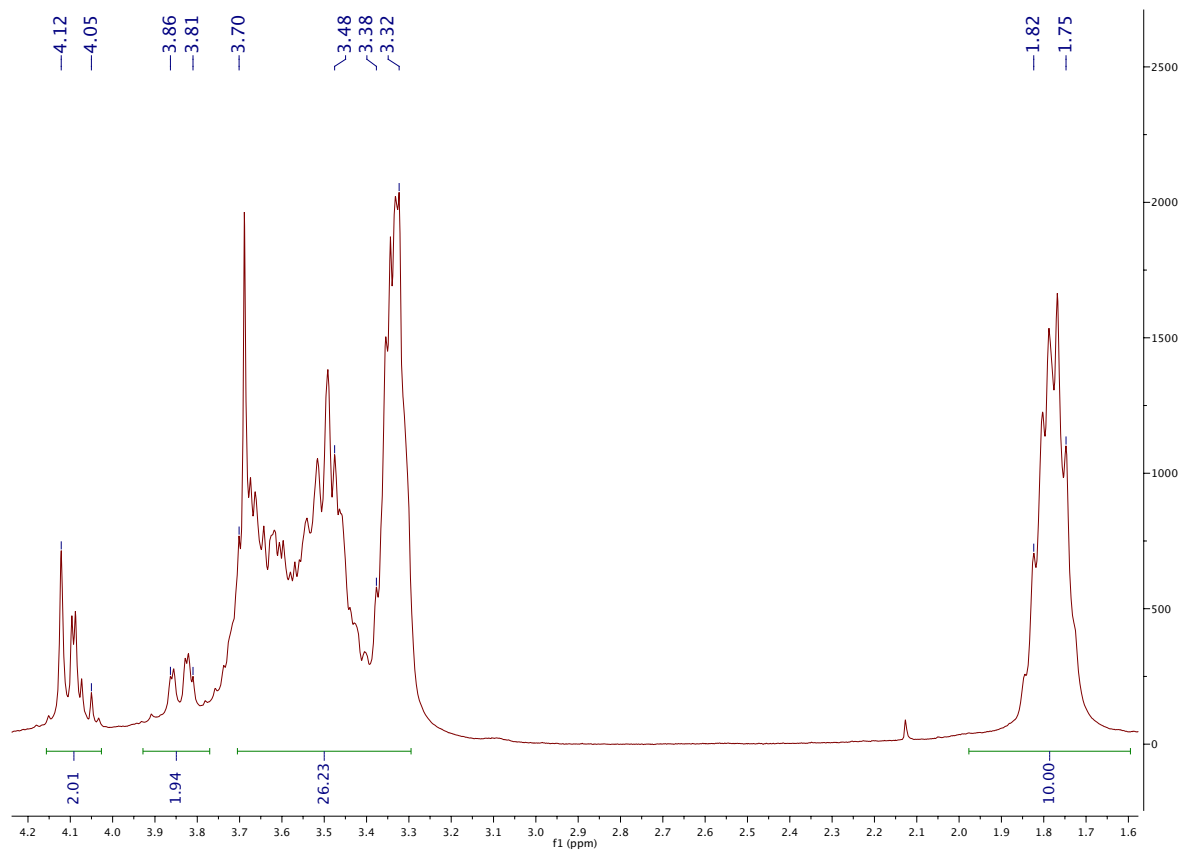


Figure 146 - Spectre RMN ^1H de 8c.

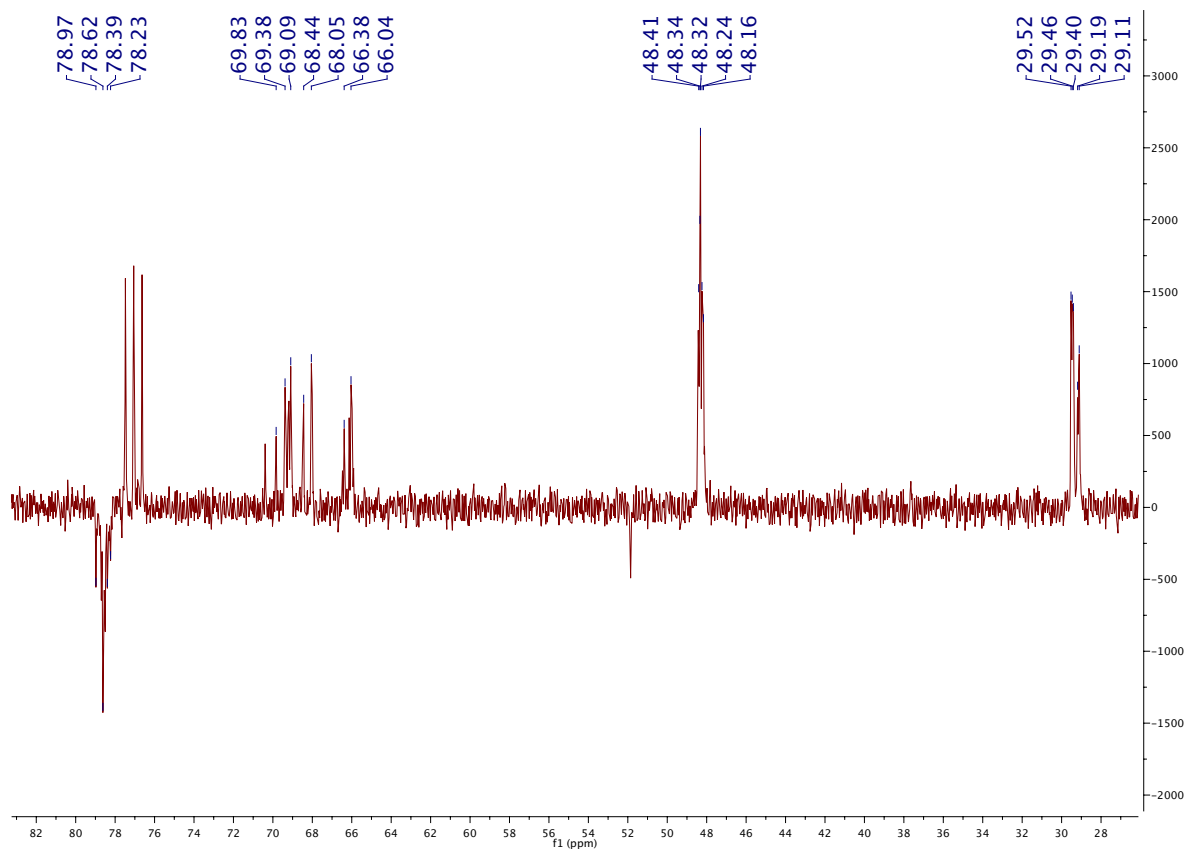
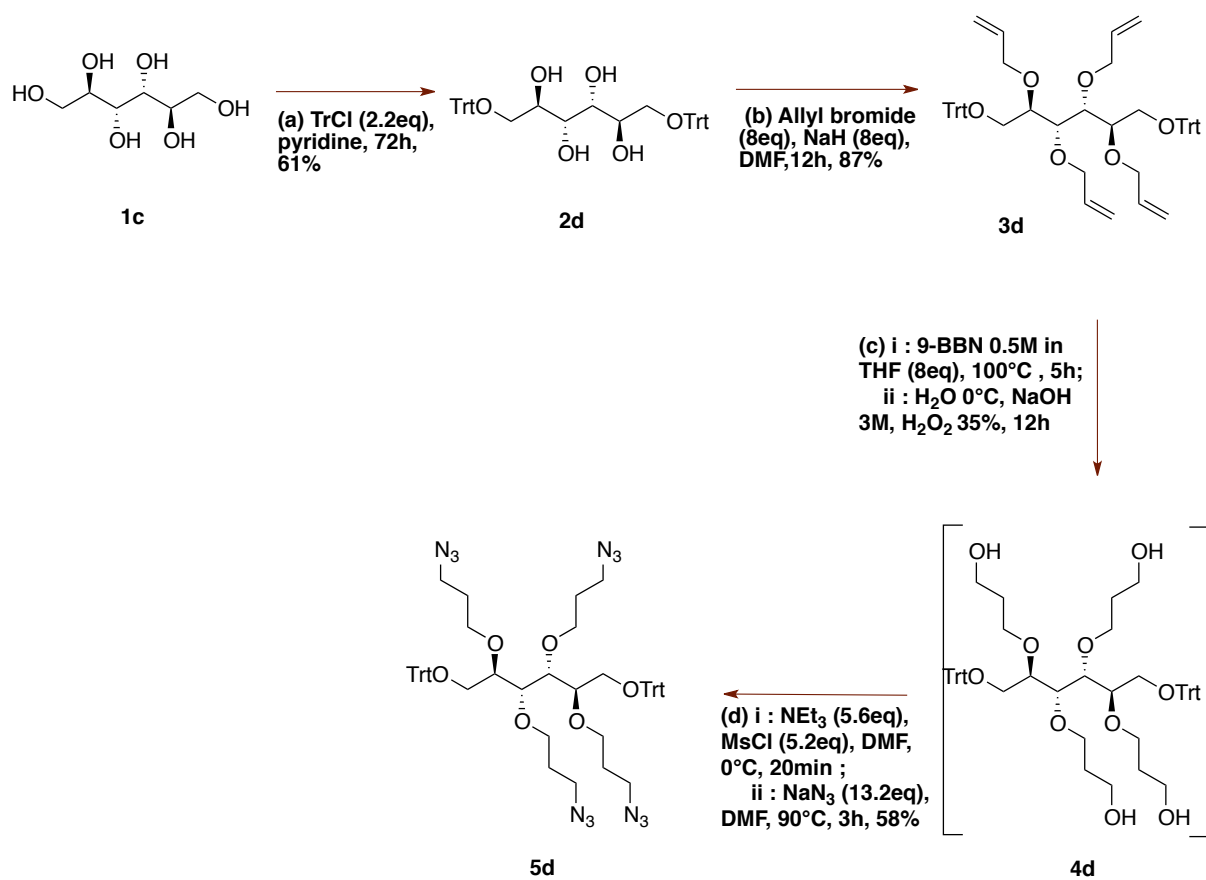
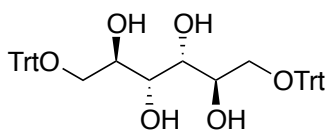


Figure 147 - Spectre RMN ^{13}C de 8c.

F. Experimental part: D-mannitol with 4 branches





Chemical Formula: $C_{44}H_{42}O_6$
Exact Mass: 666,30

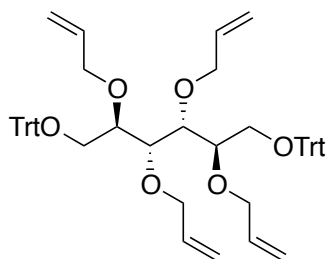
1,6-di-O-triphenylmethyl-D-mannitol (2d)

1c (1g, 5.490mmol, 1eq) was dissolved in Pyridine (55mL). Trityl chloride (3.37g, 12,08mmol, 2,2eq) and DMAP (53.7mg, 4.39mmol, 0.8eq) were added under argon atmosphere. The mixture was stirred at room temperature for 72h. Water (50mL) was added. Then, the solution was concentrated *in vacuo*. The residue was dissolved in DCM (100mL) and washed with 1M HCl (3x50mL), a saturated solution of $NaHCO_3$ (3x50mL) and with brine (3x50mL). The organic layer was dried ($MgSO_4$), filtered and concentrated *in vacuo*. The crude product was purified by silica gel chromatography (Cyclohexane/EtOAc: 30min at 70/30) to obtain **2d** (2.24g, 61%) as a white solid.

R_f =0.63 (Cyclohexane/EtOAc 5/5).

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.44-7.20 (m, 30H, $H_{ar}Trt$), 3.86-3.80(m, 2H, $CHCH_2OTrt$), 3.68-3.66 (m, 2H, $CHCHCH_2OTrt$), 3.31 (d, 4H, J =5.5Hz, CH_2OTrt), 3.05 (br s, 2H, OH), 2.84 (br s, 2H, OH).

^{13}C NMR (75MHz, $CDCl_3$) δ 143.6 (C_qTrt), 128.6 ($C_{ar}Trt$), 128.0 ($C_{ar}Trt$), 127.2 ($C_{ar}Trt$), 87.1 (C_qPh_3), 72.0 (CH_2CH_2OTrt), 70.9 ($CH_2(CH_2)_2OTrt$), 64.9 (CH_2OTrt).



Chemical Formula: $C_{56}H_{58}O_6$
Exact Mass: 826,42

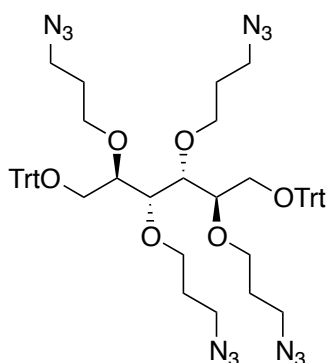
2,3,4,5-tetra-O-allyl-1,6-di-O-triphenylmethyl-D-mannitol (3d)

To a solution of **2d** (7.145g, 10.715mmol, 1eq) in DMF (60mL) placed under argon atmosphere, Allyl bromide (7.4mL, 85.723mmol, 8eq) was added. Then, NaH 60% (2.057g, 85.723mmol, 8eq) was slowly added. The mixture was stirred overnight at room temperature. MeOH (12mL) was added. Then, the solution was concentrated *in vacuo*. The residue was dissolved in DCM (100mL) and washed with brine (3x50mL). The organic layer was dried ($MgSO_4$), filtered and concentrated *in vacuo*. The crude product was purified by silica gel (Cyclohexane/EtOAc: 3min at 100/0, 10min at 98/2, 10min at 95/5 then 10min at 90/10) to obtain **3d** (7.71g, 87%) as a white solid.

R_f=0.2 (Cyclohexane/EtOAc 8/2).

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.44-7.20 (m, 30H, $H_{ar}Trt$), 6.03-5.90 (m, 2H, OCH_2CHCH_2), 5.53-5.42 (m, 2H, OCH_2CHCH_2), 5.40-5.35 (m, dd, $J=1.2Hz, 17Hz$, 2H, OCH_2CHCH_2), 5.20-5.16 (dd, $J=1.2Hz, 11Hz$, 2H, OCH_2CHCH_2), 4.87-4.71 (m, 4H, OCH_2CHCH_2), 4.24-4.08 (m, 4H, $2 \times OCH_2CHCH_2$), 3.84-3.78 (m, 6H, $2 \times CHCH_2OTrt$, $2 \times OCH_2CHCH_2$), 3.56-3.49 (m, 4H, $2 \times CH_2OTrt$, $2 \times CHCHCH_2OTrt$), 3.04-2.99 (dd, $J=3.9Hz, 10.5Hz$, 2H, $2 \times CH_2OTrt$).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 144.2 (C_qTrt), 135.3 (OCH_2CHCH_2), 135.0 (OCH_2CHCH_2), 128.9 ($C_{ar}Trt$), 127.8 ($C_{ar}Trt$), 126.9 ($C_{ar}Trt$), 116.0 (OCH_2CHCH_2), 86.4 (C_qPh_3), 78.4 (CH_2CH_2OTrt), 78.4 ($CH_2(CH_2)_2OTrt$), 73.3 (OCH_2CHCH_2), 70.8 (OCH_2CHCH_2), 61.9 (CH_2OTrt).



Chemical Formula: $C_{56}H_{62}N_{12}O_6$
Exact Mass: 998,49

2,3,4,5-tetra-O-(3-azidopropoxy)-1,6-di-O-triphenylmethyl-D-mannitol (5d)

9-BBN 0.5M in THF (150mL, 74.635mmol, 8eq) was added to **3d** (7.71g, 9.329mmol, 1eq) under argon atmosphere. The mixture was stirred at 100°C for 5h. Then, the reaction was cooled down at 0°C, H₂O at 0°C (75mL), 3M NaOH (200mL) and H₂O₂ 35% (200mL) were slowly added. The mixture was stirred overnight at room temperature. The solution was diluted with DCM (200mL), washed with a saturated solution of Na₂S₂O₃ (3x100mL) and with brine (3x100mL). The organic layer was dried (MgSO₄), filtered and concentrated *in vacuo*.

The white solid obtained was directly dissolved under argon atmosphere in DMF (22mL) and cooled down at 0°C. NEt₃ (6.75mL, 48.535mmol, 5.6eq) and MsCl (3.63mL, 45.068mmol, 5.2eq) were slowly added. The mixture was stirred at 0°C for 20min.

NaN₃ (7.44g, 114.404mmol, 13.2eq), DMF (10mL) and few drops of water were added. The mixture was stirred at 90°C for 3h. Then, the solution was concentrated *in vacuo*. The residue was dissolved in DCM (100mL) and washed with brine (3x100mL). The organic layer was dried (MgSO₄), filtered and concentrated *in vacuo*. The crude product was purified by silica gel chromatography (Cyclohexane/EtOAc: 3min at 100/0 then 12min at 90/10) to obtain **5d** (5.41g, 58%) as a yellowish liquid.

R_f=0.58 (Cyclohexane/EtOAc 9/1).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.43-7.16 (m, 30H, *H*_{ar}Trt), 3.81-3.68 (m, 4H, 2xOCH₂(CH₂)₂N₃), 3.48-3.28 (m, 14H, CHO(CH₂)₃N₃, 2xCH₂OTrt, 2xOCH₂(CH₂)₂N₃, 2xCH₂N₃), 3.03-2.79 (m, 6H, 2xCH₂N₃, 2xCH₂OTrt), 1.88-1.73 (m, 4H, CH₂CH₂N₃), 1.45-1.38 (m, 2H, CH₂CH₂N₃).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 143.9 ($C_q\text{Trt}$), 128.8 ($C_{ar}\text{Trt}$), 127.8 ($C_{ar}\text{Trt}$), 127.1 ($C_{ar}\text{Trt}$), 86.5 ($C_q\text{Ph}_3$), 78.6 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OTrt}$), 77.3 ($\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{OTrt}$), 68.5 (OCH_2), 66.5 (OCH_2), 61.5 (CH_2OTrt), 48.5 (CH_2N_3), 48.3 (CH_2N_3), 29.6 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$), 29.4 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$).

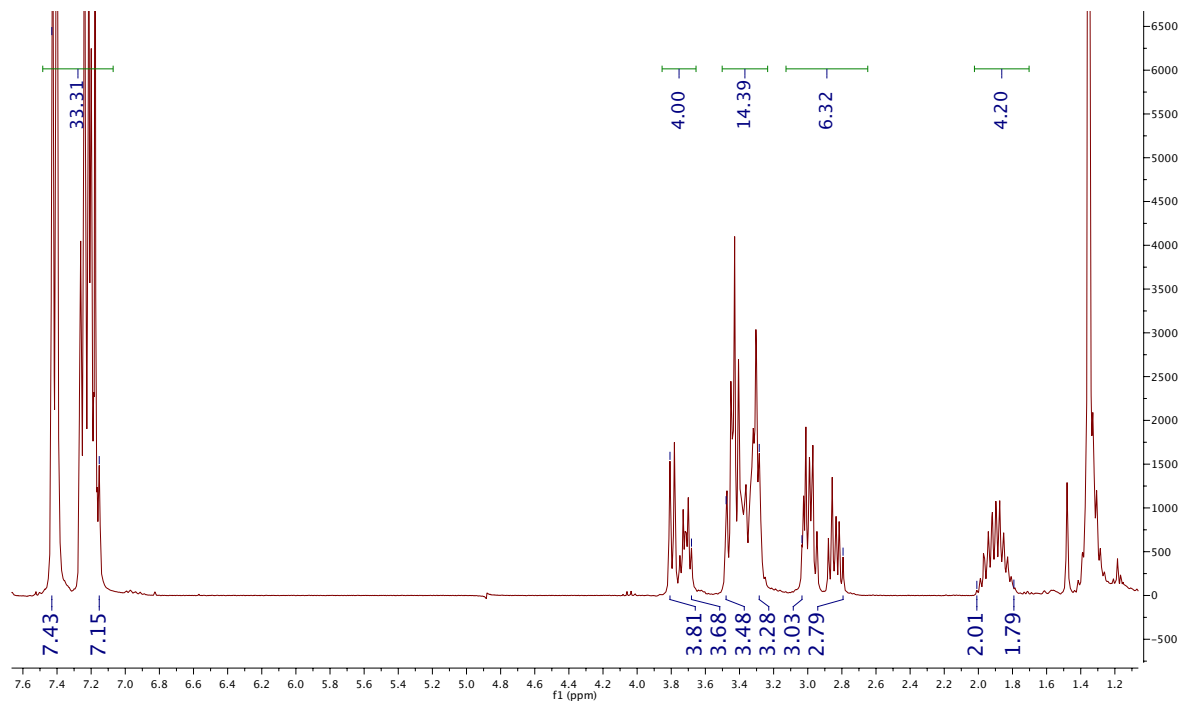


Figure 148 - Spectre RMN ^1H de 5d.

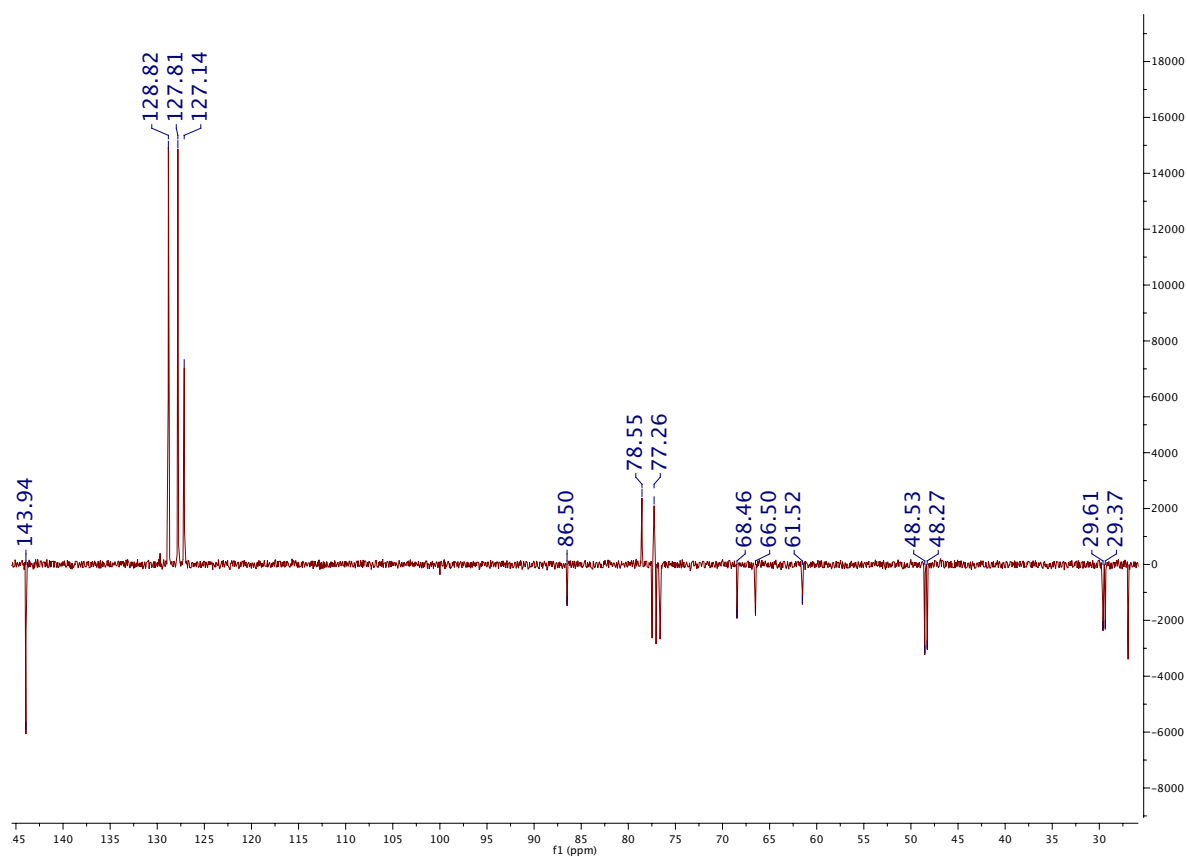


Figure 149 - Spectre RMN ^{13}C de 5d.

II. Peptide Synthesis

A. Methods

1. Materials

All reagents were purchased from commercial suppliers and used without further purification unless noted otherwise.

Vessels for manual SPPS: Polypropylene Torviq syringes (sizes 5, 10 or 20 mL) equipped with a porous polypropylene disc at the bottom and closed with an appropriate cap.

Freeze dryer: Freeze dryer Alpha 2/4 from Bioblock Scientific.

RP-HPLC: A Waters systems and a Dionex systems respectively connected to Breeze and Chromeleon softwares. Waters systems consisted of a binary pump (Waters 1525) and a dual wavelength UV/Visible Absorbance detector (Waters 2487). It was equipped with a preparative cell, for purification purposes.

Dionex system consisted of an analytical automated LC system (Ultimate 3000) equipped with an autosampler, a pump block composed of two ternary gradient pumps and a dual wavelength detector.

Columns: C8 analytical and semi-preparative columns from Waters or AIT (300 Å pore size).

Mass spectrometer: Peptides characterization by MALDI-TOF MS (DE-Pro, PerSeptive Biosystems) in positive ion reflector mode using the matrix DHB. The m/z of the protonated molecule (first isotope) are given as experimental (calcd), theoretical (found).

ATR-FTIR: ATR-FTIR spectra were recorded on a Spectrum 100 FT-IR Spectrometer (PerkinElmer).

2. Coupling monitoring using the Kaiser test

Kaiser test was used as a qualitative colorimetric test to detect the presence or the absence of free amino groups in the deprotection and protection steps. Blue resin beads indicate a positive test while colorless resin beads indicate a negative one.

The test needs three different solutions:

- A ninhydrin solution: prepared by dissolving 5g of ninhydrin in 100mL ethanol.
- A phenol solution: prepared by dilution 80g of liquefied phenol in 20mL ethanol.
- A KCN solution: prepared by mixing 2mL of a aqueous 0.001M potassium cyanide solution and 98mL pyridine.

The test was performed by transferring few resin beads in a small glass tube. Two drops of each of the solutions above were added to the beads and the suspension was heated for 3 min at approximately 100°C.

3. Peptide analysis and purification

Peptides were purified using a semi-preparative HPLC system and analyzed using an analytical HPLC system.

Solvents used were: A. H₂O/TFA (0.1%) and B. MeCN/TFA (0.1%). UV detection was always done at 220 nm and when possible at 280 nm for the Trt containing peptides.

For purification, peptides were dissolved in buffer A or when insoluble either in aqueous acetic acid (up to 20%). Before injections peptide solutions were filtrated.

Purification gradients were chosen to get a ramp of approximately 1% buffer B per min in the interest area (around 15min). Peptide fractions from purification were analyzed by analytical HPLC and by mass spectrometer, pooled according to their purity, partly concentrated under *vacuum* and freeze-dried to get the expected peptide as a powder.

Final peptide purity was checked on an analytical column using a linear gradient.

4. Preparation of resins 2-chlorotrityl resin

A solution of Fmoc-S-Trityl-L-cysteine (414mg) and DIEA (0.8mmol, 0.35mL, 4eq) in dry DCM (10mL) was added to a 2-chlorotrityl resin (1g, 0.2mmol/g) placed in a

fritted syringe. The mixture was mechanically stirred for 2 hours at room temperature. The resin was washed with DCM/MeOH/DIPEA (17/2/1, 3x10mL), DCM (4x10mL) and MeOH (3x10mL).

5. Preparation of Rink amide resin

The rink amide resin (1g, 0.2mmol/g) was treated with piperidine/DMF 20% for 5 minutes (3x5mL). Deprotection completion was monitored using a Kaiser test. The resin was washed with DMF (5x5mL).

To Boc-Lysine(Fmoc) (0.6mmol, 281mg, 3eq) in DMF (10mL), HBTU (0.59mmol, 224mg, 2.95eq), HOBT (0.59mmol, 94mg, 2.95eq), and then DIEA (1.2mmol, 209 μ L, 6eq) were added. The mixture was stirred for 1 minute with a vortex before being added to the rink amide resin. The reaction was mechanically stirred for 1 hour at room temperature. Coupling completion was monitored using a Kaiser test. Then, the resin was washed with DMF (5x5mL) and with MeOH (3x5mL) before being dried.

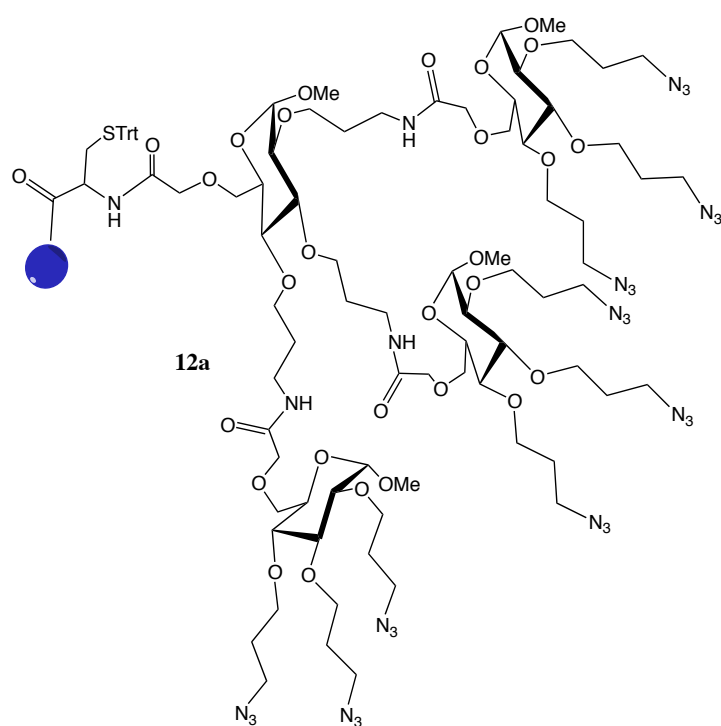
B. Dendrimer with 9 α -Fucoses, a S-Trt-Cysteine from methyl α -D-glucopyranoside (**15a**)

1. Coupling

The 2-cholorotrityl resin pre-loaded with a Fmoc-S-Trityl-L-cysteine (250mg, 0.2mmol/g) was swollen with DCM for 30 minutes. Then, the resin was treated with piperidine/NMP 20% for 5 minutes (3x5mL). Deprotection completion was monitored using colorimetric Kaiser test. The resin was washed with NMP (5x5mL).

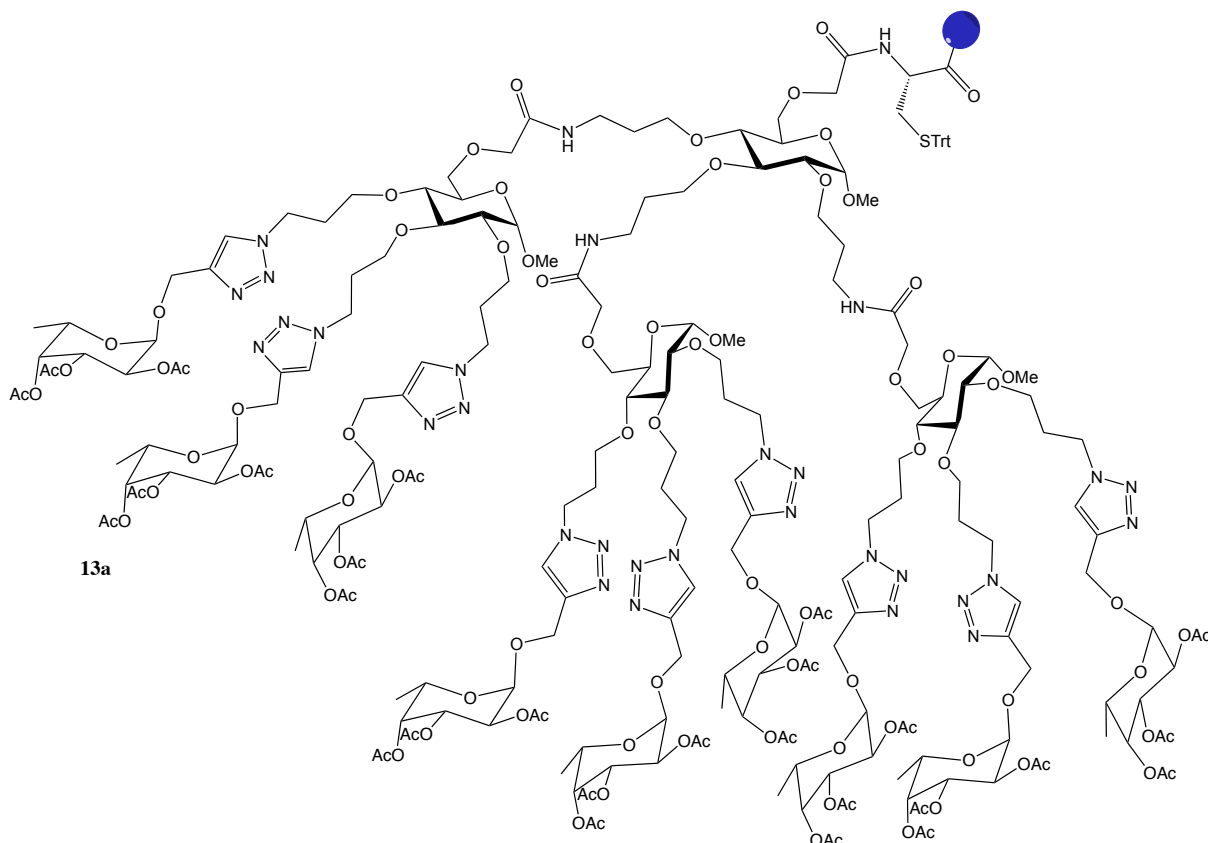
To **10a** (0.15mmol, 163.5mg, 3eq) in NMP (5mL), HBTU (0.148mmol, 55.9mg, 2.95eq), HOBT (0.148mmol, 19.9mg, 2.95eq), and then DIEA (0.3mmol, 52.3 μ L, 6eq) were added. The mixture was stirred for 1 minute with a vortex before being added to the resin. The reaction was mechanically stirred for 1 hour at room temperature. Coupling completion was monitored using a Kaiser test. **11a** was washed with NMP (5x5mL) and then was treated with piperidine/NMP 20% for 5 minutes (3x5mL). Deprotection completion was monitored using a Kaiser test. The resin was washed with NMP (5x5mL).

To **8a** (0.45mmol, 225.6mg, 9eq) in NMP (5mL), HBTU (0.443mmol, 167.8mg, 8.85eq), HOBT (0.443mmol, 59.8mg, 8.85eq), and then DIEA (0.9mmol, 156.8 μ L, 18eq) were added. The mixture was stirred for 1 minute with a vortex before being added to the resin. The reaction was mechanically stirred for 1 hour at room temperature. Coupling completion was monitored using a Kaiser test. Then, **12a** was washed with NMP (5x5mL) and with MeOH (3x5mL) before being dried.



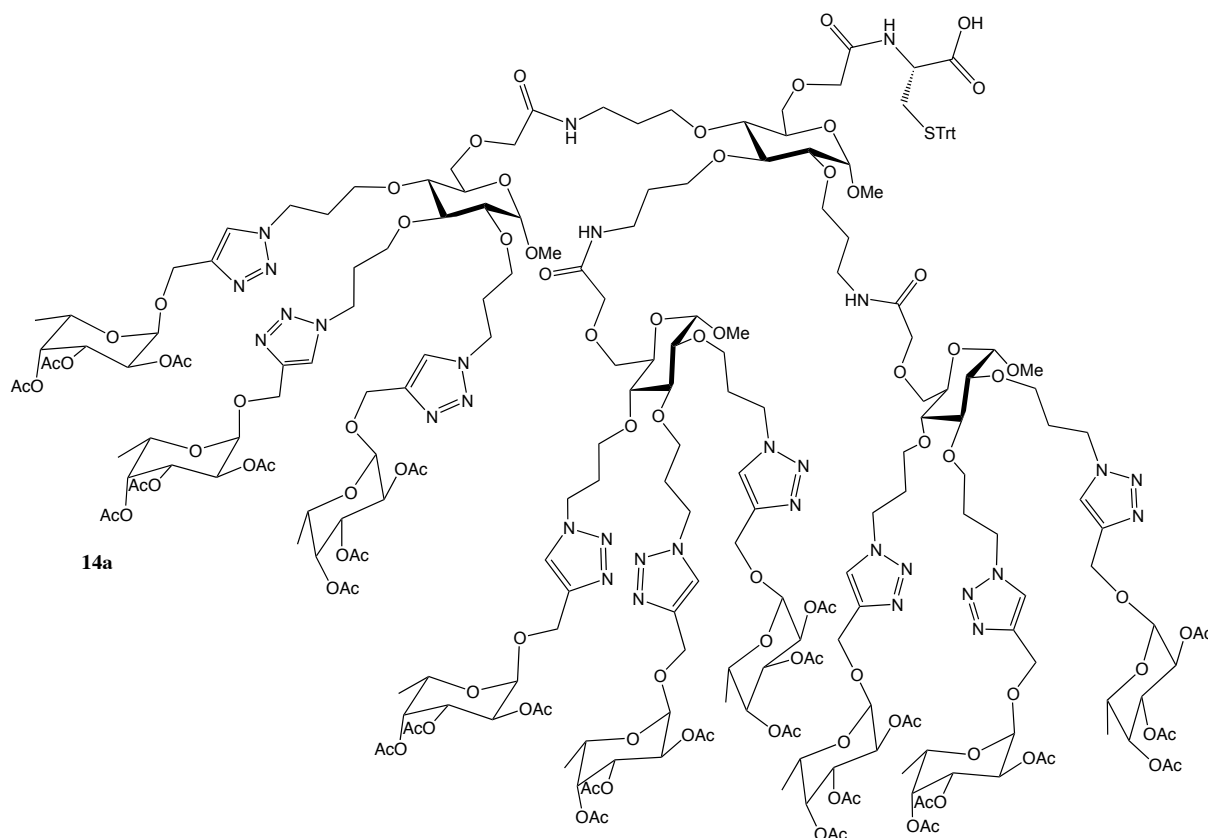
2. CuAAC

To a fritted syringe, **12a** (0.05mmol, 0.2mmol/g), Cu(OAc)₂ (1.8mmol, 327mg, 36eq) and L-ascorbic acid (0.9mmol, 159mg, 18eq) were added. A solution of **23** (0.9mmol, 295mg, 18eq) and DIEA (2.25mmol, 0.38mL, 45eq) in NMP/Pyridine (2.8mL/1.2mL) was prepared, sonicated for 1 minute before being added to the fritted syringe. The blue mixture turned to brown (reduction of Cu(II) into Cu(I)) and was mechanically stirred for 48 hours at room temperature. Then, **13a** was washed with NMP (3x5mL), NMP/Pyridine/ascorbic acid (6/5/(0.02g/mL), 3x5mL), DCM (3x5mL), MeOH (3x5mL) and NMP (3x5mL).



3. Cleavage

A solution of TFA in DCM 0.8% (5x5mL) was added to the resin and the mixture was mechanically stirred for 3 minutes each time. The resultant was neutralized in a solution of DIEA in DCM 20% (15mL). Then, the solution was concentrated *in vacuo*.



Chemical Formula: $C_{229}H_{323}N_{31}O_{102}S$
Exact Mass: 5171,08

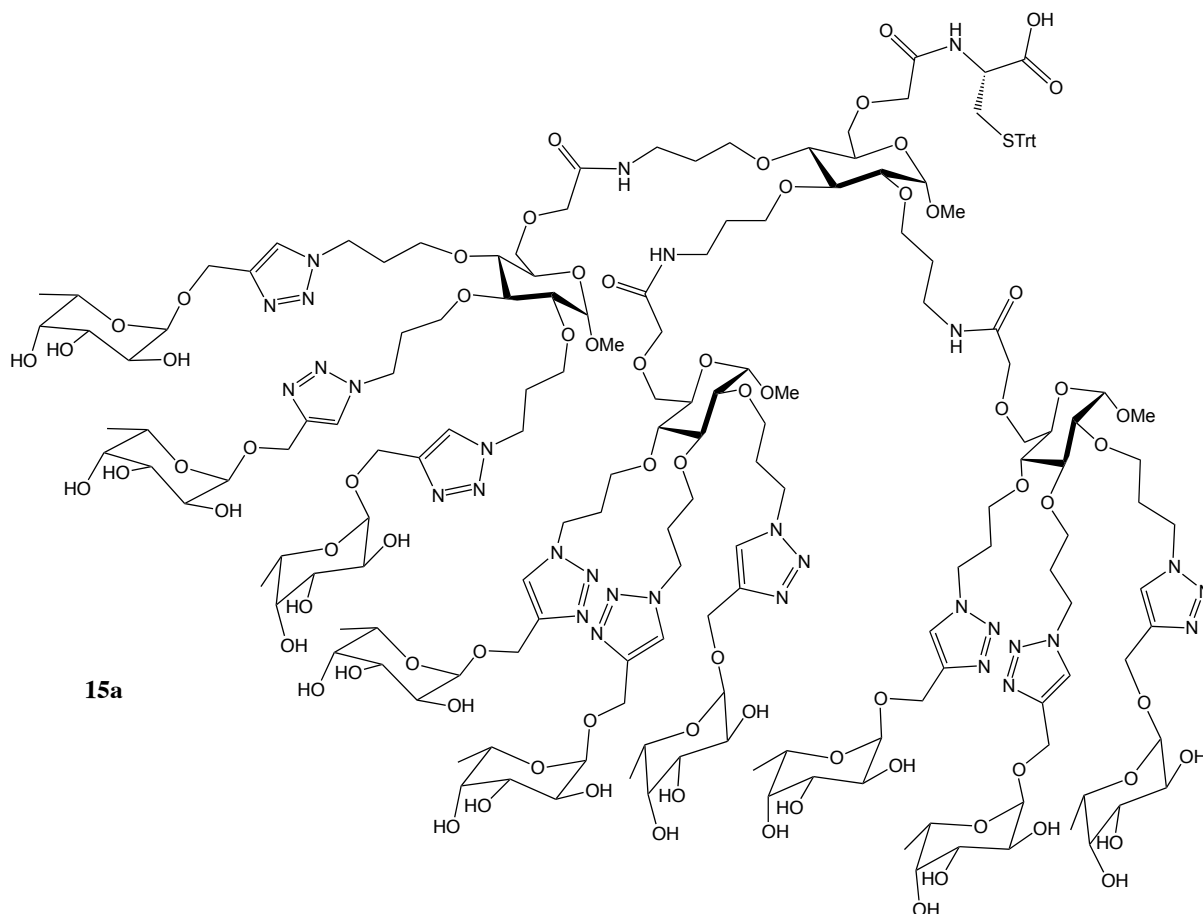
4. Desacetylation

with NaOH

The crude product was dissolved in MeOH (13.5mmol, 13.5mL, 270eq) pre-cooled at 0°C, 1M NaOH (13.5mL) was added. The mixture was stirred for 12 hours at room temperature. HCl 1M (13.5mL) was added. Then, the solution was concentrated *in vacuo*. The product was precipitated by addition of pre-cooled Et₂O, centrifuged for 10 minutes at 10000 rpm and lyophilized.

with IRA resin

The crude product (0.05mmol, 1eq) was dissolve in MeOH/H₂O (15mL/15mL). Amberlite resin IRA 400 OH⁻ (1.4 meq/mL, 15g) was added and the mixture was stirred for 12 hours at room temperature. The resin was then filtered and washed with MeOH and H₂O. Then, the solution was concentrated *in vacuo*. The product was precipitated by addition of pre-cooled Et₂O, centrifuged for 10 minutes at 10000 rpm and lyophilized.



Chemical Formula: C₁₇₅H₂₆₉N₃₁O₇₅S
Exact Mass: 4036,79

5. Purification and analysis

The product was purified by RP-HPLC on a C8 column using a linear acetonitrile (with 0.1% TFA) gradient in an aqueous solution (H₂O with 0.1% TFA) (15 to 30 %ACN in 30minutes). Retention time of the product was 12.7 minutes for 5 to 100% ACN in 30minutes and 6minutes for 15 to 50% in 10 minutes. The final glycodendrimer **15a** (3.1mg, 1.5%) was obtained as a white foam and characterized by MALDI-TOF MS (m/z) [MH]⁺ calcd 4037.80, found 4035,893.

^1H NMR (300 MHz, D_2O) δ 7.89-7.83 (m, 9H, $\text{CH}_{\text{Triazole}}$), 7.16 (app. s, 15H, $H_{ar}\text{Trt}$), 4.85 (app.s, 9H, H_1Fuc), 4.73 (br, 4H, H_1Glu), 4.59-4.50 (m, 18H, $\text{OCH}_2\text{-Triazole}$), 4.31-4.22 (m, 18H, $\text{O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-Triazole}$), 3.92-3.04 (m, 113H, H_2Glu , H_3Glu , H_4Glu , H_5Glu , H_2Fuc , H_3Fuc , H_4Fuc , H_5Fuc , $\text{C}_2\text{GluOCH}_2$, $\text{C}_5\text{GluOCH}_2$, NHCOCH_2 , $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$, CH_3Glu , NHCHCOOH , NHCH_2STrt), 2.04-1.89(m, 18H, OCH_2CH_2), 1.70-1.50 (m, 6H, OCH_2CH_2), 0.96 (d, $J=6\text{Hz}$, 27H, CH_3Fuc).

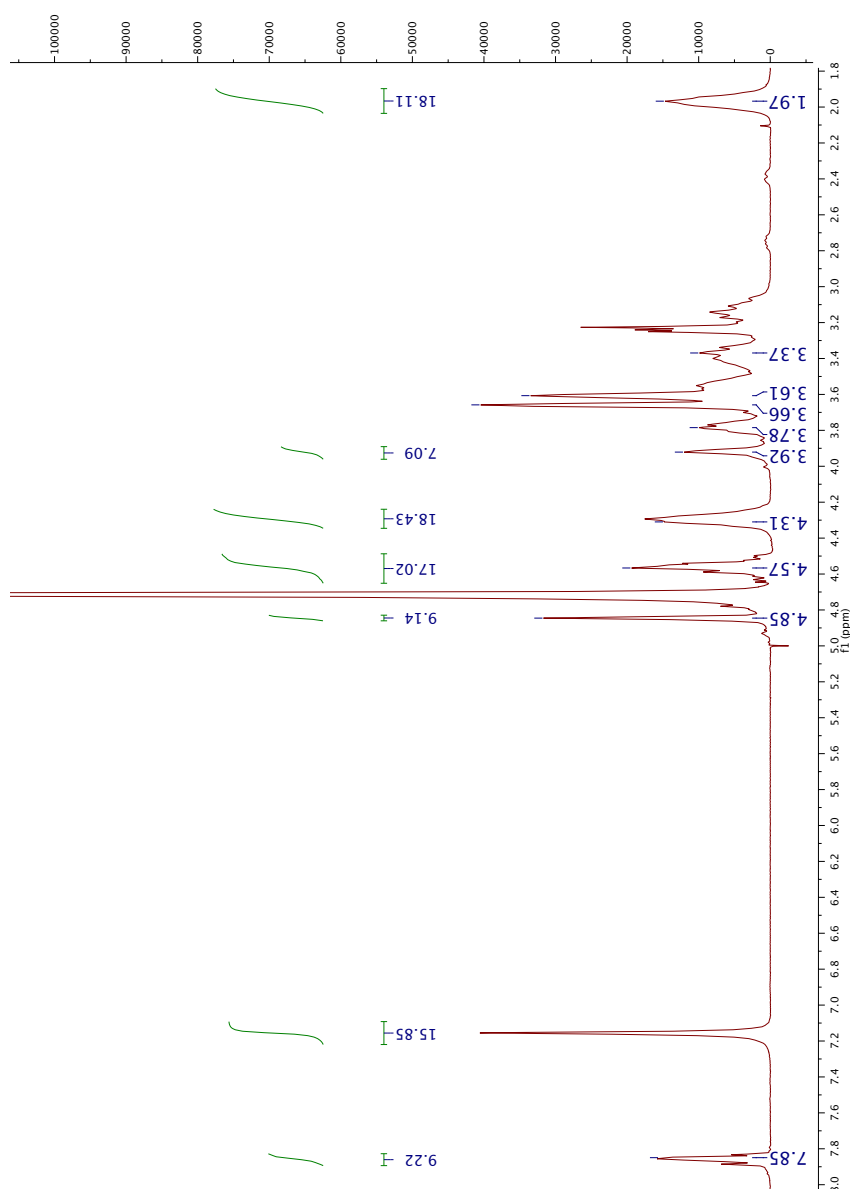


Figure 150 - Spectre RMN ^1H de 15a.

C. Dendrimer with 27 α -Fucoses, a S-Trt-Cysteine from methyl α -D-glucopyranoside (20a)

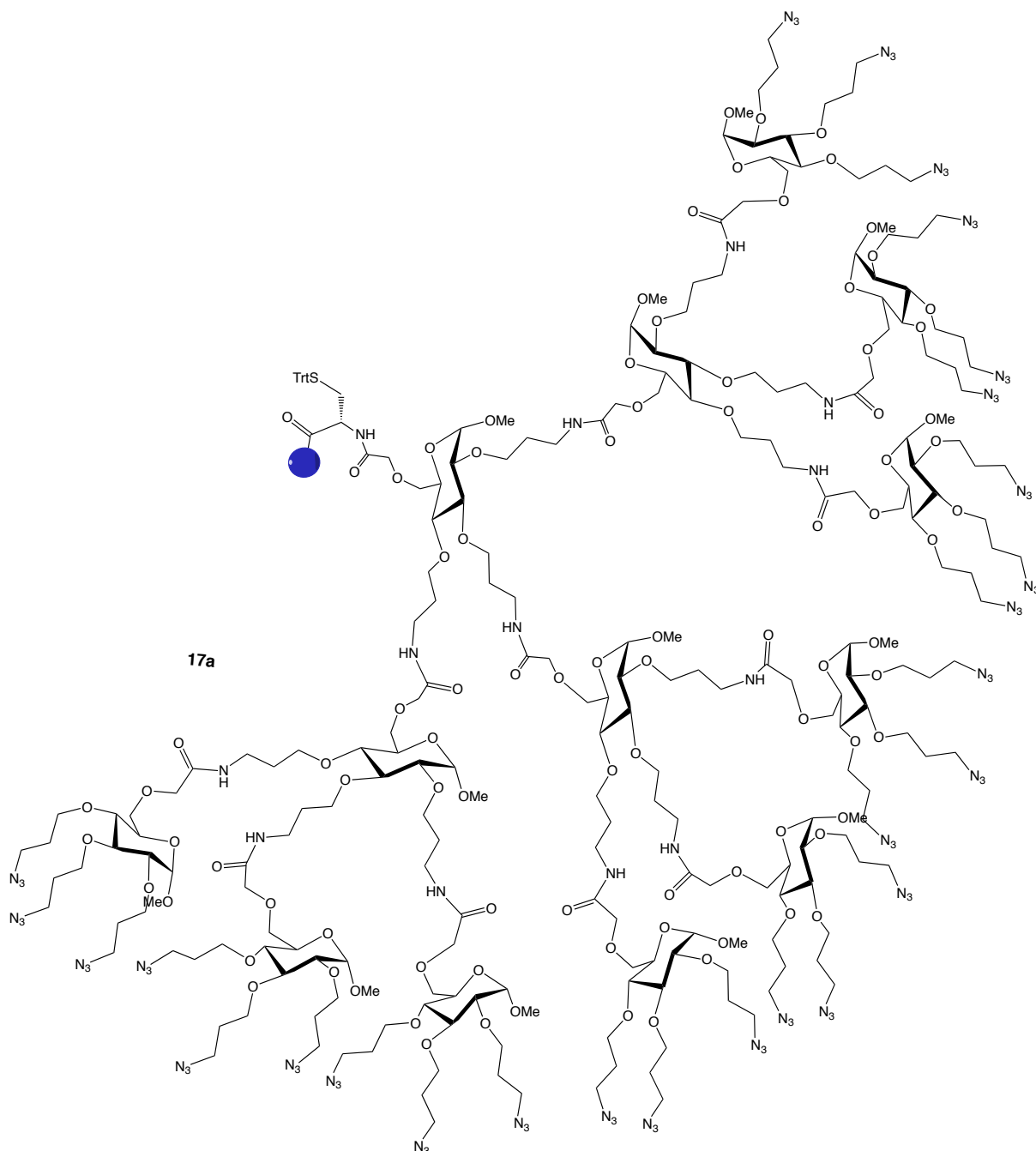
1. Coupling

The 2-chlorotriptyl resin pre-loaded with a Fmoc-S-Trityl-L-cysteine (250mg, 0.2mmol/g) was swollen with DCM for 30 minutes. Then, the resin was treated with piperidine/NMP 20% for 5 minutes (3x5mL). Deprotection completion was monitored using colorimetric Kaiser test. The resin was washed with NMP (5x5mL).

To **10a** (0.15mmol, 163.5mg, 3eq) in NMP (5mL), HBTU (0.148mmol, 55.9mg, 2.95eq), HOBT (0.148mmol, 19.9mg, 2.95eq), and then DIEA (0.3mmol, 52.3 μ L, 6eq) were added. The mixture was stirred for 1 minute with a vortex before being added to the resin. The reaction was mechanically stirred for 1 hour at room temperature. Coupling completion was monitored using a Kaiser test. The resin was washed with NMP (5x5mL) and then was treated with piperidine/NMP 20% for 5 minutes (3x5mL). Deprotection completion was monitored using a Kaiser test. The resin was washed with NMP (5x5mL).

To **10a** (0.45mmol, 327mg, 9eq) in NMP (5mL), HBTU (0.443mmol, 167.8mg, 8.85eq), HOBT (0.443mmol, 59.8mg, 8.85eq), and then DIEA (0.9mmol, 156.8 μ L, 18eq) were added. The mixture was stirred for 1 minute with a vortex before being added to the resin. The reaction was mechanically stirred for 1 hour at room temperature. Coupling completion was monitored using a Kaiser test. The resin was washed with NMP (5x5mL) and then was treated with piperidine/NMP 20% for 5 minutes (3x5mL). Deprotection completion was monitored using a Kaiser test. The resin was washed with NMP (5x5mL).

To **8a** (1.35mmol, 676.7mg, 27eq) in NMP (5mL), HBTU (1.328mmol, 503.5mg, 26.55eq), HOBT (1.328mmol, 179.3mg, 26.55eq), and then DIEA (2.7mmol, 470.3μL, 54eq) were added. The mixture was stirred for 1 minute with a vortex before being added to the resin. The reaction was mechanically stirred for 2 hours at room temperature. Coupling completion was monitored using a Kaiser test. Then, **17a** was washed with NMP (5x5mL) and with MeOH (3x5mL) before being dried.



2. CuAAC

To a fritted syringe, **17a** (0.05mmol, 0.2mmol/g), Cu(OAc)₂ (5.4mmol, 981mg, 108eq) and L-ascorbic acid (2.7mmol, 476mg, 54eq) were added. A solution of **23** (2.7mmol, 886mg, 54eq) and DIEA (6.75mmol, 1.15mL, 135eq) in NMP/Pyridine (2mL/0.9mL) was prepared, sonicated for 1minute before being added to the fritted syringe. The blue mixture turned to brown (reduction of Cu(II) into Cu(I)) and was mechanically stirred for 48hours at room temperature. Then, the resin was washed with NMP (3x5mL), NMP/Pyridine/ascorbic acid (6/5/(0.02g/mL), 3x5mL), DCM (3x5mL), MeOH (3x5mL) and NMP (3x5mL).

3. Cleavage

A solution of TFA in DCM 0.8% (5x5mL) was added to the resin and the mixture was mechanically stirred for 3minutes each time. The resultant was neutralized in a solution of DIEA in DCM 20% (15mL). Then, the solution was concentrated *in vacuo*.

4. Desacetylation

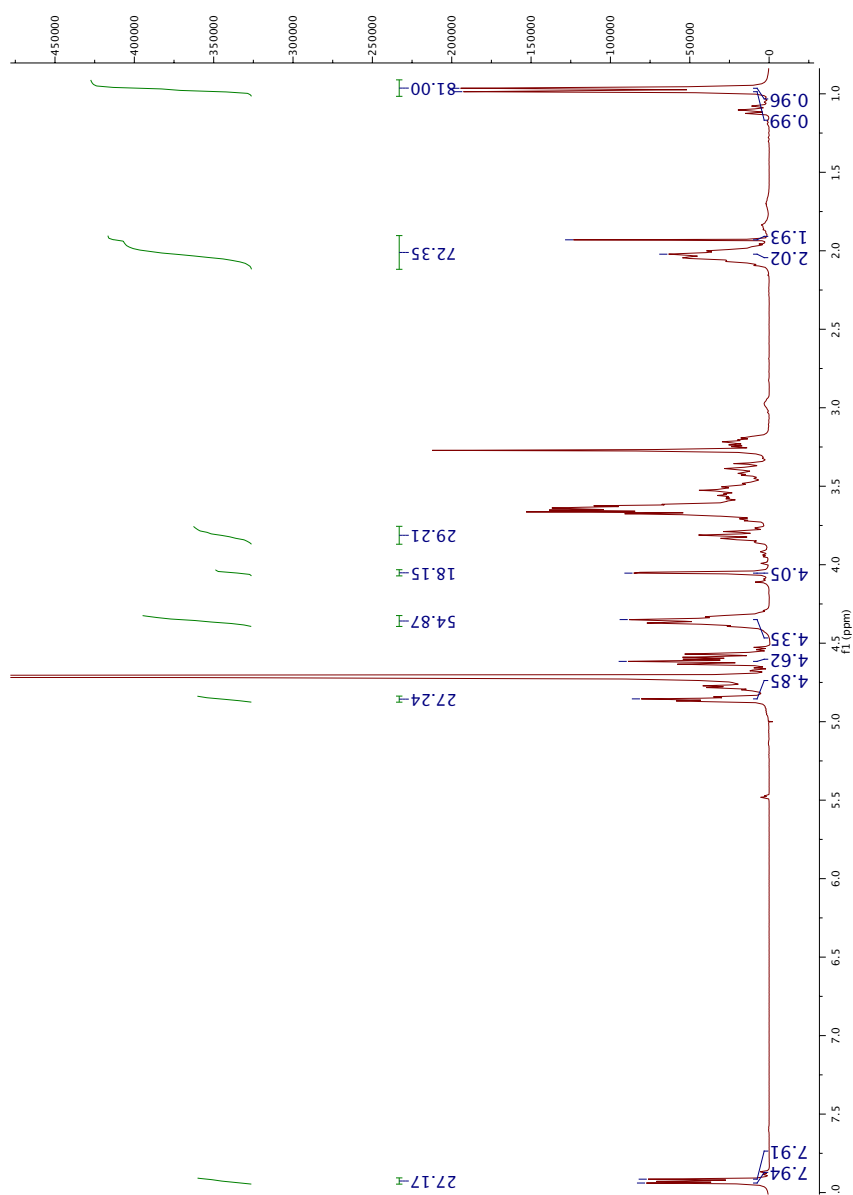
The residue was dissolved in MeOH (40.5mL) pre-cooled at 0°C, 1M NaOH (40.5mmol, 40.5mL, 810eq) was added. The mixture was stirred for 12 hours at room temperature. 1M HCl (40.5mL) was added. Then, the solution was concentrated *in vacuo*. The product was precipitated by addition of pre-cooled Et₂O, centrifuged for 10 minutes at 10000 rpm and lyophilized.

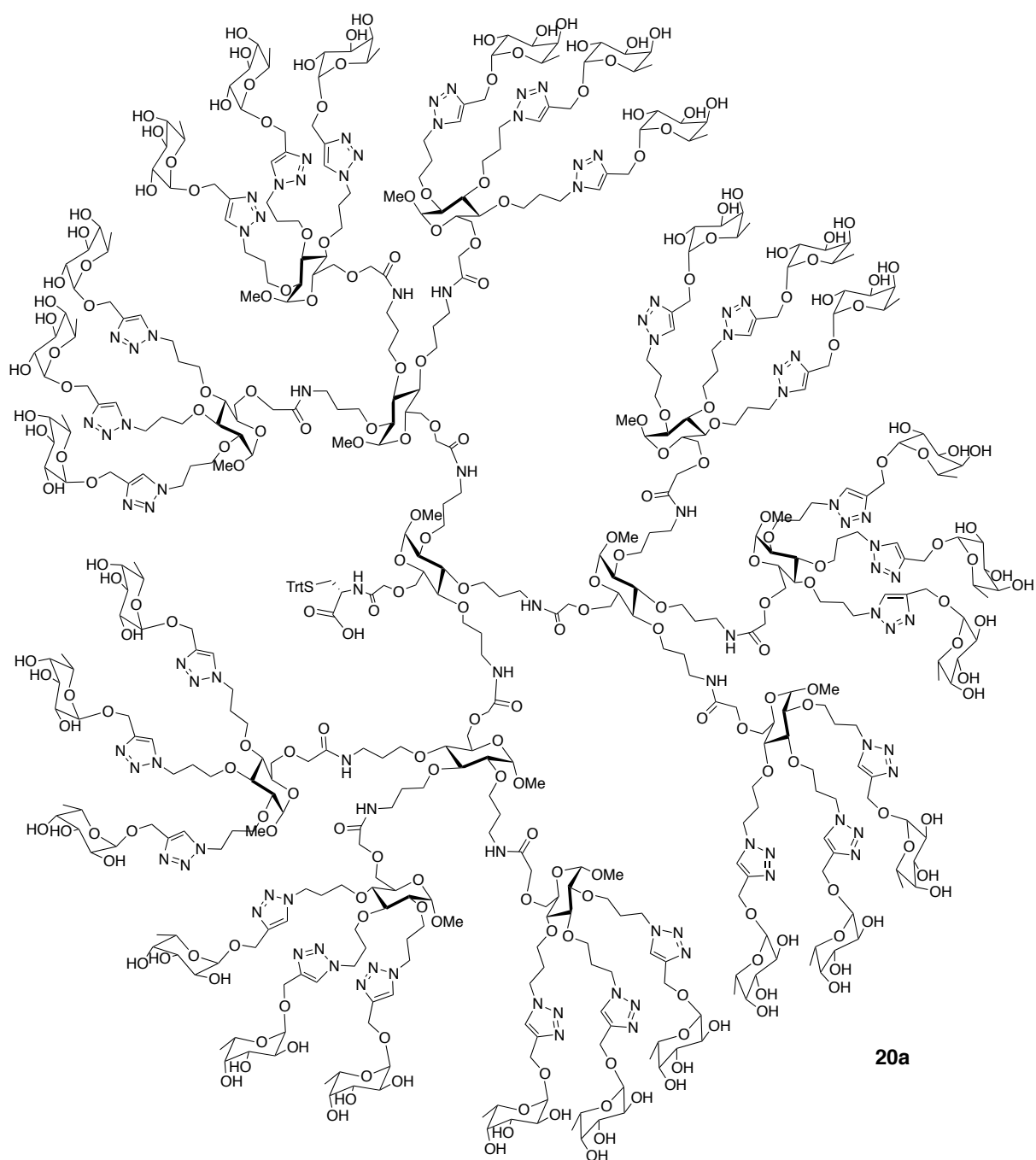
5. Purification and analysis

The product was purified by RP-HPLC on a C8 column using a linear acetonitrile (0.1% TFA) gradient in an aqueous solution (0.1% TFA) (1 to 50 %ACN in 10 minutes). Retention time of the product was 9.17 minutes (5-100% acetonitrile over 30 minutes). The final glycodendrimer **20a** (7.9mg, 1.3%) was obtained as a white foam.

¹H NMR (300 MHz, D₂O) δ 7.93-7.86 (m, 27H, CH_{Triazole}), 4.86-4.84 (m, 27H, H_{1 Fuc}), 4.73 (br, 13H, H_{1 Glu}), 4.64-4.49 (m, 54H, OCH₂-Triazole), 4.35-4.23 (m, 54H, O-CH₂-CH₂-CH₂-Triazole), 4.00-3.07 (m, 306H, H_{2 Glu}, H_{3 Glu}, H_{4 Glu}, H_{5 Glu}, H_{2 Fuc}, H_{3 Fuc}, H_{4 Fuc}, H_{5 Fuc}, C₂

GluOCH₂, C₃ GluOCH₂, C₄ GluOCH₂, C₅ GluOCH₂, NHCOCH₂, OCH₂CH₂CH₂NH, CH₃ Glu, NHCHCOOH, NHCH₂STrt), 2.10-1.90 (m, 78H, OCH₂CH₂), 0.97 (d, J=6Hz, 81H, CH₃ Fuc).





20a

Chemical Formula: $C_{499}H_{800}N_{94}O_{228}S$
Exact Mass: 11789,36

D.Dendrimer with 9 α -Fucoses, a Lysine from methyl α -D-glucopyranoside

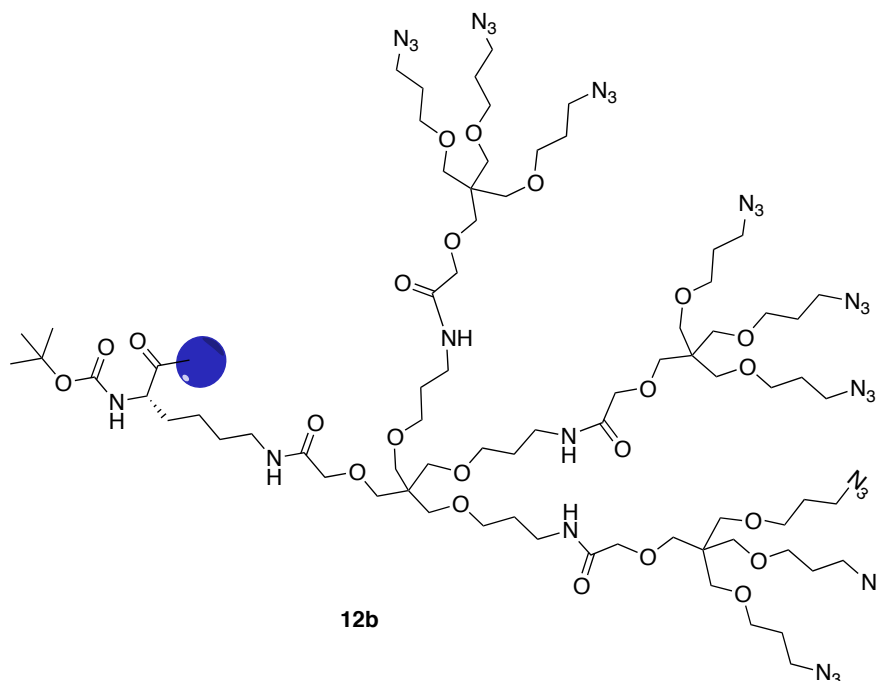
1. Coupling

The rink amide resin pre-loaded with a Boc-Lysine(Fmoc) (250mg, 0.2mmol/g) was swollen with DCM for 30 minutes. Then, the resin was treated with piperidine/DMF 20% for 5minutes (3x5mL). Deprotection completion was monitored using colorimetric Kaiser test. The resin was washed with DMF (5x5mL).

To **8b** (0.15mmol, 66.5mg, 3eq) in DMF (5mL), HATU (0.148mmol, 56.1mg, 2.95eq), HOAt (0.148mmol, 20.1mg, 2.95eq), and then DIEA (0.3mmol, 52.3 μ L, 6eq) were added. The mixture was stirred for 1 minute with a vortex before being added to the resin. The reaction was mechanically stirred for 1 hour at room temperature. Coupling completion was monitored using a Kaiser test. **11b** was washed with DMF (5x5mL).

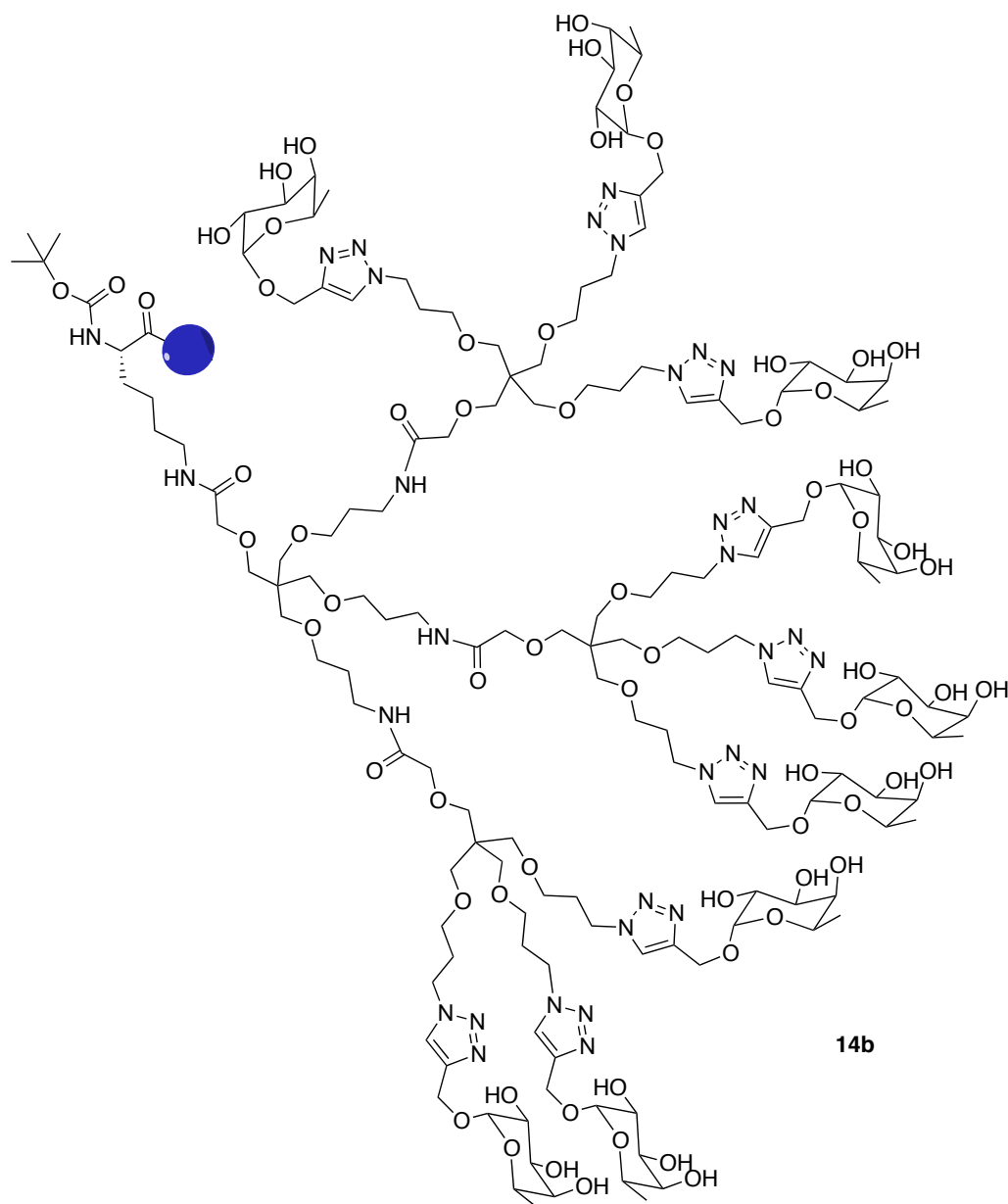
To **11b**, 1,3-propanedithiol (25eq) in NEt₃ was added. The mixture was stirred for 12 hours at room temperature. The resin was washed with DMF (5x5mL), MeOH (3x5mL) and DMF (5x5mL). Reaction completion was monitored using a Kaiser test.

To **8b** (0.45mmol, 199.45mg, 9eq) in DMF (5mL), HATU (0.443mmol, 168.2mg, 8.85eq), HOAt (0.443mmol, 59.8mg, 8.85eq), and then DIEA (0.9mmol, 156.8 μ L, 18eq) were added. The mixture was stirred for 1 minute with a vortex before being added to the resin. The reaction was mechanically stirred for 1 hour at room temperature. Coupling completion was monitored using a Kaiser test. Then, **12b** was washed with DMF (5x5mL) and with MeOH (3x5mL) before being dried.



2. CuAAC

To a fritted syringe, **12b** (0.05mmol, 0.2mmol/g), $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ (1.8mmol, 327mg, 36eq) and L-ascorbic acid (0.9mmol, 159mg, 18eq) were added. A solution of **24** (0.9mmol, 181.9mg, 18eq) and DIEA (2.25mmol, 0.38mL, 45eq) in DMF/Pyridine (2.8mL/1.2mL) was prepared, sonicated for 1 minute before being added to the fritted syringe. The blue mixture turned to brown (reduction of $\text{Cu}(\text{II})$ into $\text{Cu}(\text{I})$) and was mechanically stirred for 48 hours at room temperature. Then, **13b** was washed with DMF (3x5mL), DMF/Pyridine/ascorbic acid (6/5/(0.02g/mL), 3x5mL), DCM (3x5mL), MeOH (3x5mL) and DMF (3x5mL).

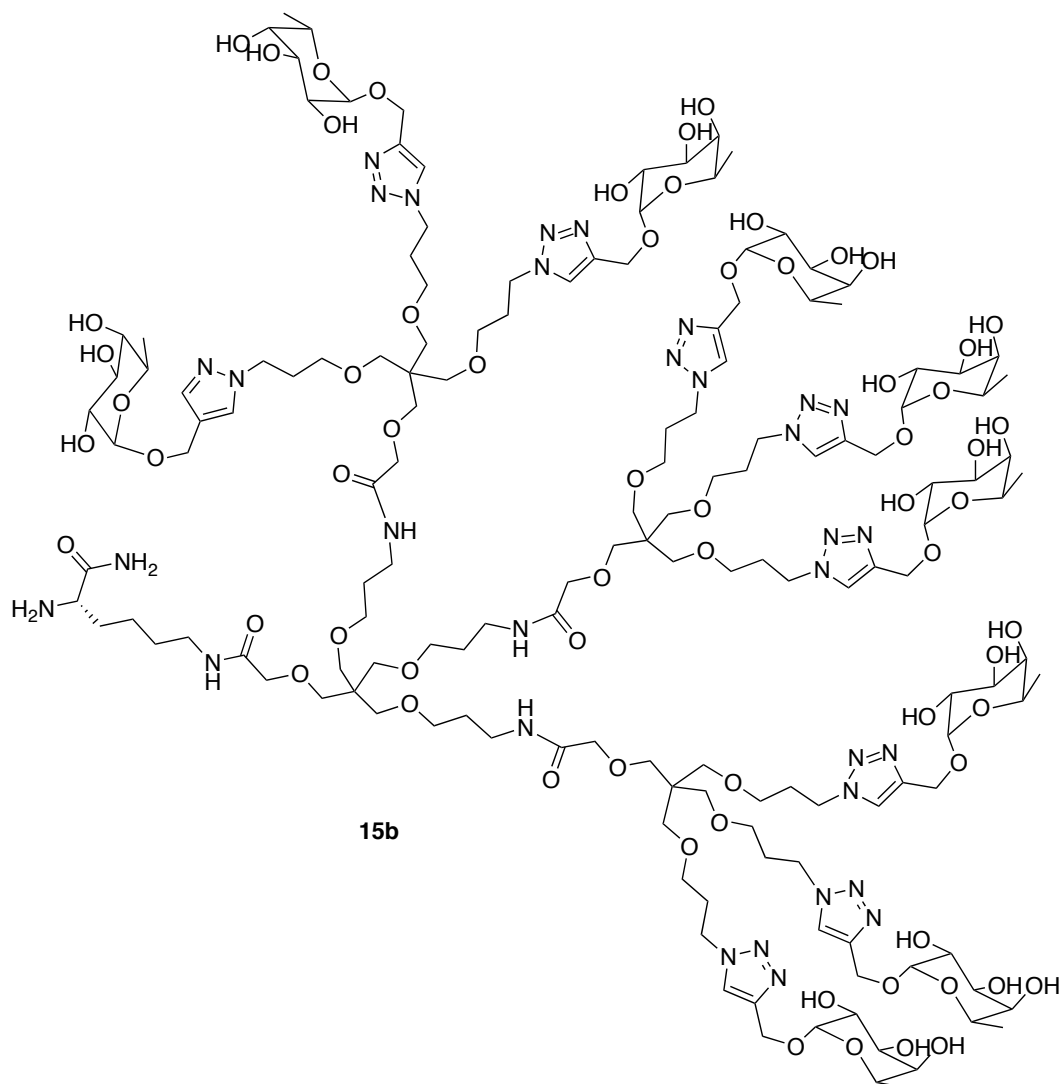


3. Cleavage

A solution of TFA/H₂O/TIS (95/2.5/2.5, 5mL) was added to the resin and the mixture was mechanically stirred for 2 hours at room temperature. The resin was removed by filtration and washed with TFA. Then, the solution was concentrated *in vacuo*. The product was precipitated by addition of pre-cooled Et₂O, centrifuged for 10 minutes at 10000 rpm and lyophilized.

4. Chelex treatment

To the crude product in H₂O (5mL), Chelex resin (205mg) was added. The reaction was mechanically stirred for 3 hours at room temperature, then filtered and lyophilized.



Chemical Formula: C₁₅₂H₂₅₆N₃₂O₆₆
Exact Mass: 3585,77

Bibliographie

- (1) Banchereau, J.; Briere, F.; Caux, C.; Davoust, J.; Lebecque, S.; Liu, Y.-J.; Pulendran, B.; Palucka, K. Immunobiology of Dendritic Cells. *Annu. Rev. Immunol.* **2000**, *18* (1), 767–811.
- (2) Banchereau, J.; Steinman, R. M. Dendritic Cells and the Control of Immunity. *Nature* **1998**, *392* (6673), 245–252.
- (3) Hart, D. N. J. Dendritic Cells: Unique Leukocyte Populations Which Control the Primary Immune Response. *Blood* **1997**, *90* (9), 3245–3287.
- (4) Ziegler-Heitbrock, L.; Ancuta, P.; Crowe, S.; Dalod, M.; Grau, V.; Hart, D. N.; Leenen, P. J. M.; Liu, Y.-J.; MacPherson, G.; Randolph, G. J.; et al. Nomenclature of Monocytes and Dendritic Cells in. *Blood* **2010**, *116* (16), e74–e80.
- (5) *Les Défenses de L'organisme*; Pour la science, Ed.
- (6) Medzhitov, R.; Janeway, J., Charles. The Toll Receptor Family and Microbial Recognition. *Trends Microbiol.* **2000**, *8* (10), 452–456.
- (7) Medzhitov, R.; Janeway, C. J. Innate Immune Recognition: Mechanisms and Pathways. *Immunol. Rev.* **2000**, *173* (1), 89–97.
- (8) Fraser, I. P.; Koziel, H.; Ezekowitz, R. A. B. The Serum Mannose-Binding Protein and the Macrophage Mannose Receptor Are Pattern Recognition Molecules That Link Innate and Adaptive Immunity. *Semin. Immunol.* **1998**, *10* (5), 363–372.
- (9) Triantafilou, M.; Triantafilou, K. Lipopolysaccharide Recognition: CD14, TLRs and the LPS-Activation Cluster. *Trends Immunol.* **2002**, *23* (6), 301–304.
- (10) Janeway, C. A.; Medzhitov, R. Innate Immune Recognition. *Annu. Rev. Immunol.* **2002**, *20* (1), 197–216.
- (11) Engering, A. J.; Cella, M.; Fluitsma, D.; Brockhaus, M.; Hoefsmit, E. C. M.; Lanzavecchia, A.; Pieters, J. The Mannose Receptor Functions as a High Capacity and Broad Specificity Antigen Receptor in Human Dendritic Cells. *Eur. J. Immunol.* **1997**, *27* (9), 2417–2425.
- (12) Jiang, W.; Swiggard, W. J.; Heufler, C.; Peng, M.; Mirza, A.; Steinman, R. M.;

- Nussenzweig, M. C. The Receptor DEC-205 Expressed by Dendritic Cells and Thymic Epithelial Cells Is Involved in Antigen Processing. *Nature* **1995**, 375 (6527), 151–155.
- (13) Inaba, K.; Inaba, M.; Naito, M.; Steinman, R. M. Dendritic Cell Progenitors Phagocytose Particulates, Including Bacillus Calmette-Guerin Organisms, and Sensitize Mice to Mycobacterial Antigens in Vivo. *J. Exp. Med.* **1993**, 178 (2), 479–488.
- (14) Rescigno, M.; Granucci, F.; Citterio, S.; Foti, M.; Ricciardi-Castagnoli, P. Coordinated Events during Bacteria-Induced DC Maturation. *Immunol. Today* **1999**, 20 (5), 200–203.
- (15) Périé, L. Implication Du VIH Dans La Distribution Des Cellules Dendritiques Entre Les Compartiments Des Organes Lymphoïdes et Du Sang, Agro Paris Tech, 2009.
- (16) Faure-André, G.; Vargas, P.; Yuseff, M.-I.; Heuzé, M.; Diaz, J.; Lankar, D.; Steri, V.; Manry, J.; Hugues, S.; Vascotto, F.; et al. Regulation of Dendritic Cell Migration by CD74, the MHC Class II: Associated Invariant Chain. *Science* **2008**, 322 (5908), 1705–1710.
- (17) Bousso, P. T-Cell Activation by Dendritic Cells in the Lymph Node: Lessons from the Movies. *Nat. Rev. Immunol.* **2008**, 8 (9), 675–684.
- (18) Miller, M. J.; Wei, S. H.; Parker, I.; Cahalan, M. D. Two-Photon Imaging of Lymphocyte Motility and Antigen Response in Intact Lymph Node. *Science* **2002**, 296 (5574), 1869–1873.
- (19) Bousso, P.; Robey, E. Dynamics of CD8+ T Cell Priming by Dendritic Cells in Intact Lymph Nodes. *Nat. Immunol.* **2003**, 4 (6), 579–585.
- (20) Brode, S.; Macary, P. A. Cross-Presentation: Dendritic Cells and Macrophages Bite off More than They Can Chew! *Immunology* **2004**, 112 (3), 345–351.
- (21) Melief, C. J. M. Mini-Review: Regulation of Cytotoxic T Lymphocyte Responses by Dendritic Cells: Peaceful Coexistence of Cross-Priming and Direct Priming? *Eur. J. Immunol.* **2003**, 33 (10), 2645–2654.
- (22) McCullough, K. C.; Summerfield, A. Basic Concepts of Immune Response and Defense Development. *ILAR J.* **2005**, 46 (3), 230–240.
- (23) GLYCOPEDIA <http://www.glycopedia.eu/e-chapters/Human-Immunodeficiency-Virus-the/Structure-and-function-of-C-type> (accessed Nov 30, 2015).
- (24) Feinberg, H.; Mitchell, D. A.; Drickamer, K.; Weis, W. I. Structural Basis for

- Selective Recognition of Oligosaccharides by DC-SIGN and DC-SIGNR. *Science* **2001**, 294 (5549), 2163–2166.
- (25) Geijtenbeek, T. B. H.; Duijnhoven, G. C. F. van; Vliet, S. J. van; Krieger, E.; Vriend, G.; Figdor, C. G.; Kooyk, Y. van. Identification of Different Binding Sites in the Dendritic Cell-Specific Receptor DC-SIGN for Intercellular Adhesion Molecule 3 and HIV-1. *J. Biol. Chem.* **2002**, 277 (13), 11314–11320.
- (26) Zelensky, A. N.; Gready, J. E. The C-Type Lectin-like Domain Superfamily. *FEBS J.* **2005**, 272 (24), 6179–6217.
- (27) Guo, Y.; Feinberg, H.; Conroy, E.; Mitchell, D. A.; Alvarez, R.; Blixt, O.; Taylor, M. E.; Weis, W. I.; Drickamer, K. Structural Basis for Distinct Ligand-Binding and Targeting Properties of the Receptors DC-SIGN and DC-SIGNR. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2004**, 11 (7), 591–598.
- (28) Draube, A.; Klein-González, N.; Mattheus, S.; Brilliant, C.; Hellmich, M.; Engert, A.; von Bergwelt-Baildon, M. Dendritic Cell Based Tumor Vaccination in Prostate and Renal Cell Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS ONE* **2011**, 6 (4).
- (29) Hutson, T. E.; Figlin, R. A.; Kuhn, J. G.; Motzer, R. J. Targeted Therapies for Metastatic Renal Cell Carcinoma: An Overview of Toxicity and Dosing Strategies. *The Oncologist* **2008**, 13 (10), 1084–1096.
- (30) Leonhartsberger, N.; Ramoner, R.; Falkensammer, C.; Rahm, A.; Gander, H.; Hörtl, L.; Thurnher, M. Quality of Life during Dendritic Cell Vaccination against Metastatic Renal Cell Carcinoma. *Cancer Immunol. Immunother.* **2012**, 61 (9), 1407–1413.
- (31) Anguille, S.; Smits, E. L.; Lion, E.; van Tendeloo, V. F.; Berneman, Z. N. Clinical Use of Dendritic Cells for Cancer Therapy. *Lancet Oncol.* **2014**, 15 (7), e257–e267.
- (32) Ellis, L. M.; Bernstein, D. S.; Voest, E. E.; Berlin, J. D.; Sargent, D.; Cortazar, P.; Garrett-Mayer, E.; Herbst, R. S.; Lilenbaum, R. C.; Sima, C.; et al. American Society of Clinical Oncology Perspective: Raising the Bar for Clinical Trials by Defining Clinically Meaningful Outcomes. *J. Clin. Oncol.* **2014**, JCO.2013.53.8009.
- (33) PROVENGE - Dendreon.com <http://www.dendreon.com/products/provenge/> (accessed Jul 29, 2015).
- (34) Kirkwood, J. M.; Butterfield, L. H.; Tarhini, A. A.; Zarour, H.; Kalinski, P.; Ferrone, S. Immunotherapy of Cancer in 2012. *CA. Cancer J. Clin.* **2012**, 62 (5), 309–335.
- (35) Tel, J.; Aarntzen, E. H. J. G.; Baba, T.; Schreibelt, G.; Schulte, B. M.; Benitez-Ribas, D.;

- Boerman, O. C.; Croockewit, S.; Oyen, W. J. G.; Rossum, M. van; et al. Natural Human Plasmacytoid Dendritic Cells Induce Antigen-Specific T-Cell Responses in Melanoma Patients. *Cancer Res.* **2013**, *73* (3), 1063–1075.
- (36) Figlin, R. A. Personalized Immunotherapy (AGS-003) When Combined with Sunitinib for the Treatment of Metastatic Renal Cell Carcinoma. *Expert Opin. Biol. Ther.* **2015**, *15* (8), 1241–1248.
- (37) Wang, H.; Feng, F.; Zhu, M.; Wang, R.; Wang, X.; Wu, Y.; Zhuang, Z. [Therapeutic efficacy of dendritic cells pulsed by autologous tumor cell lysate in combination with CIK cells on advanced renal cell carcinoma]. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi Chin. J. Cell. Mol. Immunol.* **2015**, *31* (1), 67–71.
- (38) Jähnisch, H.; Füssel, S.; Kiessling, A.; Wehner, R.; Zastrow, S.; Bachmann, M.; Rieber, E. P.; Wirth, M. P.; Schmitz, M. Dendritic Cell-Based Immunotherapy for Prostate Cancer. *J. Immunol. Res.* **2010**, *2010*, e517493.
- (39) Simoens, S. Pharmaco-Economic Aspects of Sipuleucel-T. *Hum. Vaccines Immunother.* **2012**, *8* (4), 506–508.
- (40) Bonifaz, L.; Bonnyay, D.; Mahnke, K.; Rivera, M.; Nussenzweig, M. C.; Steinman, R. M. Efficient Targeting of Protein Antigen to the Dendritic Cell Receptor DEC-205 in the Steady State Leads to Antigen Presentation on Major Histocompatibility Complex Class I Products and Peripheral CD8+ T Cell Tolerance. *J. Exp. Med.* **2002**, *196* (12), 1627–1638.
- (41) Tacke, P. J.; de Vries, I. J. M.; Torensma, R.; Figdor, C. G. Dendritic-Cell Immunotherapy: From Ex Vivo Loading to in Vivo Targeting. *Nat. Rev. Immunol.* **2007**, *7* (10), 790–802.
- (42) Li, M.; Wang, B.; Wu, Z.; Shi, X.; Zhang, J.; Han, S. Treatment of Dutch Rat Models of Glioma Using EphrinA1-PE38/GM-CSF Chitosan Nanoparticles by in Situ Activation of Dendritic Cells. *Tumor Biol.* **2015**, 1–6.
- (43) Li, M.; Wang, B.; Wu, Z.; Zhang, J.; Shi, X.; Cheng, W.; Han, S. A Novel Recombinant Protein of ephrinA1-PE38/GM-CSF Activate Dendritic Cells Vaccine in Rats with Glioma. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* **2015**, *36* (7), 5497–5503.
- (44) Gargano, J. M.; Ngo, T.; Kim, J. Y.; Acheson, D. W. K.; Lees, W. J. Multivalent Inhibition of AB5 Toxins. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123* (51), 12909–12910.
- (45) Krishnamurthy, V. M.; Estroff, L. A.; Whitesides, G. M. Multivalency in Ligand

- Design. In *Fragment-based Approaches in Drug Discovery*; Jahnke, W., Erlanson, D. A., Eds.; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2006; pp 11–53.
- (46) Cecioni, S. Approche Multivalente Des Interactions Saccharides - Lectines : Synthèse de Glycoclusters et Analyse de La Reconnaissance Biomoléculaire, Université Lyon 1, 2010.
- (47) Adamson, A. W. A Proposed Approach to the Chelate Effect¹. *J. Am. Chem. Soc.* **1954**, 76 (6), 1578–1579.
- (48) Kramer, R. H.; Karpen, J. W. Spanning Binding Sites on Allosteric Proteins with Polymer-Linked Ligand Dimers. *Nature* **1998**, 395 (6703), 710–713.
- (49) Kitov, P. I.; Shimizu, H.; Homans, S. W.; Bundle, D. R. Optimization of Tether Length in Nonglycosidically Linked Bivalent Ligands That Target Sites 2 and 1 of a Shiga-like Toxin. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125 (11), 3284–3294.
- (50) Mulder, A.; Auletta, T.; Sartori, A.; Del Ciotto, S.; Casnati, A.; Ungaro, R.; Huskens, J.; Reinhoudt, D. N. Divalent Binding of a Bis(adamantyl)-Functionalized Calix[4]arene to β -Cyclodextrin-Based Hosts: An Experimental and Theoretical Study on Multivalent Binding in Solution and at Self-Assembled Monolayers. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126 (21), 6627–6636.
- (51) Di Stefano, S.; Cacciapaglia, R.; Mandolini, L. Supramolecular Control of Reactivity and Catalysis – Effective Molarities of Recognition-Mediated Bimolecular Reactions. *Eur. J. Org. Chem.* **2014**, 2014 (33), 7304–7315.
- (52) Sigalov, A. B. “Monovalent” Ligands That Trigger TLR-4 and TCR Are Not Necessarily Truly Monovalent. *Mol. Immunol.* **2012**, 51 (3–4), 356–362.
- (53) Renner, M.; Specht, C. G.; Triller, A. Molecular Dynamics of Postsynaptic Receptors and Scaffold Proteins. *Curr. Opin. Neurobiol.* **2008**, 18 (5), 532–540.
- (54) Fulton, D. A.; Stoddart, J. F. An Efficient Synthesis of Cyclodextrin-Based Carbohydrate Cluster Compounds. *Org. Lett.* **2000**, 2 (8), 1113–1116.
- (55) Ortega-Muñoz, M.; Morales-Sanfrutos, J.; Perez-Balderas, F.; Hernandez-Mateo, F.; Giron-Gonzalez, M. D.; Sevillano-Tripero, N.; Salto-Gonzalez, R.; Santoyo-Gonzalez, F. Click Multivalent Neoglycoconjugates as Synthetic Activators in Cell Adhesion and Stimulation of Monocyte/macrophage Cell Lines. *Org. Biomol. Chem.* **2007**, 5 (14), 2291–2301.
- (56) Zhang, Q.; Su, L.; Collins, J.; Chen, G.; Wallis, R.; Mitchell, D. A.; Haddleton, D. M.; Becer, C. R. Dendritic Cell Lectin-Targeting Sentinel-like Unimolecular

- Glycoconjugates To Release an Anti-HIV Drug. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136* (11), 4325–4332.
- (57) Marra, A.; Zelli, R.; D’Orazio, G.; La Ferla, B.; Dondoni, A. Synthesis and Glycosidase Inhibition Properties of Triazole-Linked Calixarene–iminosugar Clusters. *Tetrahedron* **2014**, *70* (49), 9387–9393.
- (58) Legnani, L.; Compostella, F.; Sansone, F.; Toma, L. Cone Calix[4]arenes with Orientable Glycosylthioureido Groups at the Upper Rim: An In-Depth Analysis of Their Symmetry Properties. *J. Org. Chem.* **2015**, *80* (15), 7412–7418.
- (59) Giuliani, M.; Morbioli, I.; Sansone, F.; Casnati, A. Moulding Calixarenes for Targeting Biomacromolecules. *Chem. Commun.* **2015**.
- (60) Richichi, B.; Comito, G.; Cerofolini, L.; Gabrielli, G.; Marra, A.; Moni, L.; Pace, A.; Pasquato, L.; Chiarugi, P.; Dondoni, A.; et al. Multivalent Presentation of a Hydrolytically Stable GM3 Lactone Mimetic as Modulator of Melanoma Cells Motility and Adhesion. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21* (10), 2756–2763.
- (61) Ferchichi, M.; Jeanneau, E.; Fenet, B.; Meganem, F.; Darbost, U.; Bonnamour, I. Synthesis, Characterization, and Conformational Analysis of New Perfunctionalized calix[9]arenes. *Tetrahedron Lett.* **2012**, *53* (32), 4047–4050.
- (62) Cecioni, S.; Faure, S.; Darbost, U.; Bonnamour, I.; Parrot-Lopez, H.; Roy, O.; Taillefumier, C.; Wimmerová, M.; Praly, J.-P.; Imberty, A.; et al. Selectivity among Two Lectins: Probing the Effect of Topology, Multivalency and Flexibility of “Clicked” Multivalent Glycoclusters. *Chem. – Eur. J.* **2011**, *17* (7), 2146–2159.
- (63) Jeon, I.; Lee, D.; Krauss, I. J.; Danishefsky, S. J. A New Model for the Presentation of Tumor-Associated Antigens and the Quest for an Anticancer Vaccine: A Solution to the Synthesis Challenge via Ring-Closing Metathesis. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (40), 14337–14344.
- (64) Daskhan, G. C.; Berthet, N.; Thomas, B.; Fiore, M.; Renaudet, O. Multivalent Glycocyclopeptides: Toward Nano-Sized Glycostructures. *Carbohydr. Res.* **2015**, *405*, 13–22.
- (65) Bossu, I. Conception et Synthèse de Nouveaux Glycoclusters Biologiquement Actifs, Université de Grenoble, 2011.
- (66) Ting, S. R. S.; Chen, G.; Stenzel, M. H. Synthesis of Glycopolymers and Their Multivalent Recognitions with Lectins. *Polym. Chem.* **2010**, *1* (9), 1392–1412.
- (67) Slavin, S.; Burns, J.; Haddleton, D. M.; Becer, C. R. Synthesis of Glycopolymers via

- Click Reactions. *Eur. Polym. J.* **2011**, 47 (4), 435–446.
- (68) Lu, J.; Fu, C.; Wang, S.; Tao, L.; Yan, L.; Haddleton, D. M.; Chen, G.; Wei, Y. From Polymer Sequence Control to Protein Recognition: Synthesis, Self-Assembly and Lectin Binding. *Macromolecules* **2014**, 47 (14), 4676–4683.
- (69) Fishman, J. M.; Kiessling, L. L. Synthesis of Functionalizable and Degradable Polymers by Ring-Opening Metathesis Polymerization. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, 52 (19), 5061–5064.
- (70) Disney, M. D.; Zheng, J.; Swager, T. M.; Seeberger, P. H. Detection of Bacteria with Carbohydrate-Functionalized Fluorescent Polymers. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126 (41), 13343–13346.
- (71) Gestwicki, J. E.; Cairo, C. W.; Mann, D. A.; Owen, R. M.; Kiessling, L. L. Selective Immobilization of Multivalent Ligands for Surface Plasmon Resonance and Fluorescence Microscopy. *Anal. Biochem.* **2002**, 305 (2), 149–155.
- (72) Yang, Z.-Q.; Puffer, E. B.; Pontrello, J. K.; Kiessling, L. L. Synthesis of a Multivalent Display of a CD22-Binding Trisaccharide. *Carbohydr. Res.* **2002**, 337 (18), 1605–1613.
- (73) Eissa, A. M.; Khosravi, E. Comb-Like Graft Copolymers of Poly(oxa)norbornene: Efficient Synthesis Using a Combination of ROMP and Click Chemistry. *Macromol. Chem. Phys.* **2015**, 216 (9), 964–976.
- (74) Delattre, E.; Lemièrre, G.; Desmurs, J.-R.; Boulay, B.; Duñach, E. Poly(vinyl Alcohol) Functionalization with Aldehydes in Organic Solvents: Shining Properties of Poly(vinyl Acetals). *J. Appl. Polym. Sci.* **2014**, 131 (17), n/a – n/a.
- (75) Eissa, A. M.; Cameron, N. R. Glycopolymer Conjugates. In *Bio-synthetic Polymer Conjugates*; Schlaad, H., Ed.; Advances in Polymer Science; Springer Berlin Heidelberg, 2012; pp 71–114.
- (76) Okoth, R.; Basu, A. End-Labeled Amino Terminated Monotelechelic Glycopolymers Generated by ROMP and Cu(I)-Catalyzed Azide–alkyne Cycloaddition. *Beilstein J. Org. Chem.* **2013**, 9 (1), 608–612.
- (77) Tanaka, T.; Ishitani, H.; Miura, Y.; Oishi, K.; Takahashi, T.; Suzuki, T.; Shoda, S.; Kimura, Y. Protecting-Group-Free Synthesis of Glycopolymers Bearing Sialyloligosaccharide and Their High Binding with the Influenza Virus. *ACS Macro Lett.* **2014**, 3 (10), 1074–1078.
- (78) Tanaka, T.; Nagai, H.; Noguchi, M.; Kobayashi, A.; Shoda, S. One-Step Conversion of

- Unprotected Sugars to β -Glycosyl Azides Using 2-Chloroimidazolinium Salt in Aqueous Solution. *Chem. Commun.* **2009**, No. 23, 3378–3379.
- (79) Novoa, A.; Barluenga, S.; Serba, C.; Winssinger, N. Solid Phase Synthesis of Glycopeptides Using Shoda's Activation of Unprotected Carbohydrates. *Chem. Commun.* **2013**, 49 (69), 7608–7610.
- (80) El Rassi, Z.; Nashabeh, W. Chapter 8 High Performance Capillary Electrophoresis of Carbohydrates and Glycoconjugates. In *Journal of Chromatography Library*; Rassi, Z. E., Ed.; Carbohydrate Analysis; Elsevier, 1995; Vol. 58, pp 267–360.
- (81) Hu, X.-L.; Jin, H.-Y.; He, X.-P.; James, T. D.; Chen, G.-R.; Long, Y.-T. Colorimetric and Plasmonic Detection of Lectins Using Core–Shell Gold Glyconanoparticles Prepared by Copper-Free Click Chemistry. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2015**, 7 (3), 1874–1878.
- (82) Rodriguez-Del Rio, E.; Marradi, M.; Calderon-Gonzalez, R.; Frande-Cabanes, E.; Penadés, S.; Petrovsky, N.; Alvarez-Dominguez, C. A Gold Glyco-Nanoparticle Carrying a Listeriolysin O Peptide and Formulated with Advax™ Delta Inulin Adjuvant Induces Robust T-Cell Protection against Listeria Infection. *Vaccine* **2015**, 33 (12), 1465–1473.
- (83) Frigell, J.; García, I.; Gómez-Vallejo, V.; Llop, J.; Penadés, S. ⁶⁸Ga-Labeled Gold Glyconanoparticles for Exploring Blood–Brain Barrier Permeability: Preparation, Biodistribution Studies, and Improved Brain Uptake via Neuropeptide Conjugation. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, 136 (1), 449–457.
- (84) Chiodo, F.; Enríquez-Navas, P. M.; Angulo, J.; Marradi, M.; Penadés, S. Assembling Different Antennas of the gp120 High Mannose-Type Glycans on Gold Nanoparticles Provides Superior Binding to the Anti-HIV Antibody 2G12 than the Individual Antennas. *Carbohydr. Res.* **2015**, 405, 102–109.
- (85) Marradi, M.; Chiodo, F.; García, I.; Penadés, S. Glyconanoparticles as Multifunctional and Multimodal Carbohydrate Systems. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, 42 (11), 4728–4745.
- (86) Adak, A. K.; Li, B.-Y.; Lin, C.-C. Advances in Multifunctional Glycosylated Nanomaterials: Preparation and Applications in Glycoscience. *Carbohydr. Res.* **2015**, 405, 2–12.
- (87) Gatard, S.; Salmon, L.; Deraedt, C.; Ruiz, J.; Astruc, D.; Bouquillon, S. Gold Nanoparticles Stabilized by Glycodendrimers: Synthesis and Application to the

- Catalytic Reduction of 4-Nitrophenol. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2014**, 2014 (16), 2671–2677.
- (88) de la Fuente, J. M.; Barrientos, A. G.; Rojas, T. C.; Rojo, J.; Cañada, J.; Fernández, A.; Penadés, S. Gold Glyconanoparticles as Water-Soluble Polyvalent Models To Study Carbohydrate Interactions. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40 (12), 2257–2261.
- (89) Brust, M.; Walker, M.; Bethell, D.; Schiffrin, D. J.; Whyman, R. Synthesis of Thiol-Derivatised Gold Nanoparticles in a Two-Phase Liquid–Liquid System. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1994**, No. 7, 801–802.
- (90) Enustun, B. V.; Turkevich, J. Coagulation of Colloidal Gold. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85 (21), 3317–3328.
- (91) Raveendran, P.; Fu, J.; Wallen, S. L. A Simple and “green” Method for the Synthesis of Au, Ag, and Au–Ag Alloy Nanoparticles. *Green Chem.* **2006**, 8 (1), 34–38.
- (92) Ramtenki, V.; Raju, D.; Mehta, U. J.; Ramana, C. V.; Prasad, B. L. V. Synthesis of Ag-Glyconanoparticles Using C-Glycosides, Their Lectin Binding Studies and Antibacterial Activity. *New J. Chem.* **2013**, 37 (11), 3716–3720.
- (93) Kumar, C. G.; Mamidyala, S. K.; Reddy, M. N.; Reddy, B. V. S. Silver Glyconanoparticles Functionalized with Sugars of Sweet Sorghum Syrup as an Antimicrobial Agent. *Process Biochem.* **2012**, 47 (10), 1488–1495.
- (94) Vigneshwaran, N.; Nachane, R. P.; Balasubramanya, R. H.; Varadarajan, P. V. A Novel One-Pot “green” Synthesis of Stable Silver Nanoparticles Using Soluble Starch. *Carbohydr. Res.* **2006**, 341 (12), 2012–2018.
- (95) Gallo, J.; García, I.; Padro, D.; Arnáiz, B.; Penadés, S. Water-Soluble Magnetic Glyconanoparticles Based on Metal-Doped Ferrites Coated with Gold: Synthesis and Characterization. *J. Mater. Chem.* **2010**, 20 (44), 10010–10020.
- (96) Kouyoumdjian, H.; Zhu, D. C.; El-Dakdouki, M. H.; Lorenz, K.; Chen, J.; Li, W.; Huang, X. Glyconanoparticle Aided Detection of β -Amyloid by Magnetic Resonance Imaging and Attenuation of β -Amyloid Induced Cytotoxicity. *ACS Chem. Neurosci.* **2013**, 4 (4), 575–584.
- (97) Moros, M.; Hernáez, B.; Garet, E.; Dias, J. T.; Sáez, B.; Grazú, V.; González-Fernández, Á.; Alonso, C.; de la Fuente, J. M. Monosaccharides versus PEG-Functionalized NPs: Influence in the Cellular Uptake. *ACS Nano* **2012**, 6 (2), 1565–1577.

- (98) Lartigue, L.; Innocenti, C.; Kalaivani, T.; Awwad, A.; Sanchez Duque, M. del M.; Guari, Y.; Larionova, J.; Guérin, C.; Montero, J.-L. G.; Barragan-Montero, V.; et al. Water-Dispersible Sugar-Coated Iron Oxide Nanoparticles. An Evaluation of Their Relaxometric and Magnetic Hyperthermia Properties. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133* (27), 10459–10472.
- (99) Eising, R.; Elias, W. C.; Albuquerque, B. L.; Fort, S.; Domingos, J. B. Synthesis of Silver Glyconanoparticles from New Sugar-Based Amphiphiles and Their Catalytic Application. *Langmuir* **2014**, *30* (21), 6011–6020.
- (100) Lu, A.-H.; Salabas, E. L.; Schüth, F. Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Protection, Functionalization, and Application. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46* (8), 1222–1244.
- (101) Tomalia, D. A.; Baker, H.; Dewald, J.; Hall, M.; Kallos, G.; Martin, S.; Roeck, J.; Ryder, J.; Smith, P. A New Class of Polymers: Starburst-Dendritic Macromolecules. *Polym. J.* **1985**, *17* (1), 117–132.
- (102) Newkome, G. R.; Yao, Z.; Baker, G. R.; Gupta, V. K. Micelles. Part 1. Cascade Molecules: A New Approach to Micelles. A [27]-Arborol. *J. Org. Chem.* **1985**, *50* (11), 2003–2004.
- (103) Arseneault, M.; Wafer, C.; Morin, J.-F. Recent Advances in Click Chemistry Applied to Dendrimer Synthesis. *Molecules* **2015**, *20* (5), 9263–9294.
- (104) Hawker, C. J.; Frechet, J. M. J. Preparation of Polymers with Controlled Molecular Architecture. A New Convergent Approach to Dendritic Macromolecules. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112* (21), 7638–7647.
- (105) Laine, R. A. Invited Commentary: A Calculation of All Possible Oligosaccharide Isomers Both Branched and Linear Yields 1.05×10^{12} Structures for a Reducing Hexasaccharide: The Isomer Barrier to Development of Single-Method Saccharide Sequencing or Synthesis Systems. *Glycobiology* **1994**, *4* (6), 759–767.
- (106) Dubber, M.; Lindhorst, T. K. Trehalose-Based Octopus Glycosides for the Synthesis of Carbohydrate-Centered PAMAM Dendrimers and Thiourea-Bridged Glycoclusters. *Org Lett* **2001**, *3* (25), 4019–4022.
- (107) Dubber, M.; Sperling, O.; Lindhorst, T. K. Oligomannoside Mimetics by Glycosylation of “octopus Glycosides” and Their Investigation as Inhibitors of Type 1 Fimbriae-Mediated Adhesion of Escherichia Coli. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4* (21), 3901–3912.

- (108) Wang, C.; Sanders, B.; Baker, D. C. Synthesis of a Glycodendrimer Incorporating Multiple Mannosides on a Glucoside Core. *Can. J. Chem.-Rev. Can. Chim.* **2011**, *89* (8), 959–963.
- (109) Colonna, B.; Harding, V. D.; Nepogodiev, S. A.; Raymo, F. M.; Spencer, N.; Stoddart, J. F. Synthesis of Oligosaccharide Dendrimers. *Chem. – Eur. J.* **1998**, *4* (7), 1244–1254.
- (110) Veeneman, G. H.; van Leeuwen, S. H.; van Boom, J. H. Iodonium Ion Promoted Reactions at the Anomeric Centre. II An Efficient Thioglycoside Mediated Approach toward the Formation of 1,2-Trans Linked Glycosides and Glycosidic Esters. *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31* (9), 1331–1334.
- (111) Dubber, M.; Patel, A.; Sadalpure, K.; Aumüller, I.; Lindhorst, T. K. Synthesis of Functionalized Amphiphilic Glycoconjugates and Glycoclusters. *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, *2006* (23), 5357–5366.
- (112) Sadalpure, K.; Lindhorst, T. K. A General Entry into Glycopeptide “Dendrons.” *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39* (11), 2010–2013.
- (113) Roy, R.; Baek, M.-G. Multivalent Breast Cancer T-Antigen Markers Scaffolded onto PAMAM Dendrimers; Enzymology, B.-M. in, Ed.; Recognition of Carbohydrates in Biological Systems, Part A: General Procedures; Academic Press, 2003; Vol. 362, pp 240–249.
- (114) Xue, X.-Y.; Mao, X.-G.; Li, Z.; Chen, Z.; Zhou, Y.; Hou, Z.; Li, M.-K.; Meng, J.-R.; Luo, X.-X. A Potent and Selective Antimicrobial Poly(amidoamine) Dendrimer Conjugate with LED209 Targeting QseC Receptor to Inhibit the Virulence Genes of Gram Negative Bacteria. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* **2015**, *11* (2), 329–339.
- (115) Alamry, K. A.; Georgiev, N. I.; El-Daly, S. A.; Taib, L. A.; Bojinov, V. B. A Highly Selective Ratiometric Fluorescent pH Probe Based on a PAMAM Wavelength-Shifting Bichromophoric System. *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* **2015**, *135*, 792–800.
- (116) Bellini, R. G.; Guimarães, A. P.; Pacheco, M. A. C.; Dias, D. M.; Furtado, V. R.; de Alencastro, R. B.; Horta, B. A. C. Association of the Anti-Tuberculosis Drug Rifampicin with a PAMAM Dendrimer. *J. Mol. Graph. Model.* **2015**, *60*, 34–42.
- (117) PAMAM dendrimer, ethylenediamine core, generation 2.0 solution 20 wt. % in methanol | Sigma-Aldrich
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/412406?lang=fr®ion>

- =FR (accessed Oct 3, 2015).
- (118) Schlick, K. H.; Morgan, J. R.; Weiel, J. J.; Kelsey, M. S.; Cloninger, M. J. Clusters of Ligands on Dendrimer Surfaces. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21* (17), 5078–5083.
- (119) Goodman, C. K.; Wolfenden, M. L.; Nangia-Makker, P.; Michel, A. K.; Raz, A.; Cloninger, M. J. Multivalent Scaffolds Induce Galectin-3 Aggregation into Nanoparticles. *Beilstein J. Org. Chem.* **2014**, *10* (1), 1570–1577.
- (120) Wolfenden, M.; Cousin, J.; Nangia-Makker, P.; Raz, A.; Cloninger, M. Glycodendrimers and Modified ELISAs: Tools to Elucidate Multivalent Interactions of Galectins 1 and 3. *Molecules* **2015**, *20* (4), 7059–7096.
- (121) Franiak-Pietryga, I.; Ziółkowska, E.; Ziemba, B.; Appelhans, D.; Voit, B.; Szewczyk, M.; Góra-Tybor, J.; Robak, T.; Klajnert, B.; Bryszewska, M. The Influence of Maltotriose-Modified Poly(propylene Imine) Dendrimers on the Chronic Lymphocytic Leukemia Cells in Vitro: Dense Shell G4 PPI. *Mol. Pharm.* **2013**, *10* (6), 2490–2501.
- (122) Wrobel, D.; Appelhans, D.; Signorelli, M.; Wiesner, B.; Fessas, D.; Scheler, U.; Voit, B.; Maly, J. Interaction Study between Maltose-Modified PPI Dendrimers and Lipidic Model Membranes. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **2015**, *1848* (7), 1490–1501.
- (123) Jain, K.; Kesharwani, P.; Gupta, U.; Jain, N. K. A Review of Glycosylated Carriers for Drug Delivery. *Biomaterials* **2012**, *33* (16), 4166–4186.
- (124) de Brabander-van den Berg, E. M. M.; Meijer, E. W. Poly(propylene Imine) Dendrimers: Large-Scale Synthesis by Heterogeneously Catalyzed Hydrogenations. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, *32* (9), 1308–1311.
- (125) Gupta, R.; Mehra, N. K.; Jain, N. K. Development and Characterization of Sulfasalazine Loaded Fucosylated PPI Dendrimer for the Treatment of Cytokine-Induced Liver Damage. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2014**, *86* (3), 449–458.
- (126) Arce, E.; Nieto, P. M.; Díaz, V.; Castro, R. G.; Bernad, A.; Rojo, J. Glycodendritic Structures Based on Boltorn Hyperbranched Polymers and Their Interactions with Lens Culinaris Lectin. *Bioconjug. Chem.* **2003**, *14* (4), 817–823.
- (127) Wu, P.; Malkoch, M.; Hunt, J. N.; Vestberg, R.; Kaltgrad, E.; Finn, M. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B.; Hawker, C. J. Multivalent, Bifunctional Dendrimers Prepared by Click Chemistry. *Chem. Commun.* **2005**, No. 46, 5775–5777.

- (128) Page, D.; Roy, R. Optimizing Lectin-Carbohydrate Interactions: Improved Binding of Divalent α -Mannosylated Ligands towards Concanavalin A. *Glycoconj. J.* **1997**, *14* (3), 345–356.
- (129) Turnbull, W. B.; Stoddart, J. F. Design and Synthesis of Glycodendrimers. *Rev. Mol. Biotechnol.* **2002**, *90* (3–4), 231–255.
- (130) Roy, R.; Baek, M.-G. Glycodendrimers: Novel Glycotope Isosteres Unmasking Sugar Coding. Case Study with T-Antigen Markers from Breast Cancer MUC1 Glycoprotein. *Rev. Mol. Biotechnol.* **2002**, *90* (3–4), 291–309.
- (131) Methyl α -D-glucopyranoside $\geq 99\%$ | Sigma-Aldrich
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/m9376?lang=fr®ion=FR> (accessed Sep 11, 2015).
- (132) Pentaerythritol 98% | Sigma-Aldrich
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/p4755?lang=fr®ion=FR> (accessed Sep 11, 2015).
- (133) D-Mannitol ACS reagent | Sigma-Aldrich
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/m9647?lang=fr®ion=FR> (accessed Sep 11, 2015).
- (134) Zhang, P.; Wang, A.; Cui, L.; Ling, C.-C. First Per-6-O-Tritylation of Cyclodextrins. *Org Lett* **2012**, *14* (6), 1612–1615.
- (135) Monrad, R. N.; Pipper, C. B.; Madsen, R. Synthesis of Calystegine A3 from Glucose by the Use of Ring-Closing Metathesis. *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, *2009* (20), 3387–3395.
- (136) Daniellou, R. Synthèse Chimio-Enzymatique D'oligosaccharides Sur Support Soluble Dendrimérique, Université Paris 11, 2003.
- (137) 9-Borabicyclo[3.3.1]nonane solution 0.5 M in THF | Sigma-Aldrich
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/151076?lang=fr®ion=FR> (accessed Sep 4, 2015).
- (138) Mcgeary, R. P.; Toth, I. Carbohydrate-Based Templates for Synthetic Vaccines and Drug Delivery. *Tetrahedron* **2001**, *57* (41), 8733–8742.
- (139) Dhillon, R. *Hydroboration and Organic Synthesis*; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2007.
- (140) Hanessian, S.; Prabhanjan, H.; Qiu, D.; Nambiar, S. Synthesis of Chemically and Functionally Diverse Scaffolds from Pentaerythritol. *Can. J. Chem.* **1996**, *74* (9),

- 1731–1737.
- (141) Arslantas, E.; Smith-Jones, P. M.; Ritter, G.; Schmidt, R. R. TAME-Hex A – A Novel Bifunctional Chelating Agent for Radioimmunoimaging. *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, 2004 (19), 3979–3984.
- (142) Conrow, R. E.; Dean, W. D. Diazidomethane Explosion. *Org. Process Res. Dev.* **2008**, 12 (6), 1285–1286.
- (143) Peet, N. P.; Weintraub, P. M. Azide Explosions Discussed Further. *Chem. Eng. News* **1994**, 72 (11), 4–0.
- (144) Ghosh, K. K.; Ha, H.-H.; Kang, N.-Y.; Chandran, Y.; Chang, Y.-T. Solid Phase Combinatorial Synthesis of a Xanthone Library Using Click Chemistry and Its Application to an Embryonic Stem Cell Probe. *Chem. Commun.* **2011**, 47 (26), 7488–7490.
- (145) Alonso-López, M.; Martin-lomas, M.; Penades, S.; Bosso, C.; Ulrich, J. New Chiral Macrocyclic Compounds from D-Mannitol. *J. Carbohydr. Chem.* **1986**, 5 (4), 705–710.
- (146) Wang, S.; Galanos, N.; Rousset, A.; Buffet, K.; Cecioni, S.; Lafont, D.; Vincent, S. P.; Vidal, S. Fucosylation of Triethyleneglycol-Based Acceptors into “clickable” α -Fucosides. *Carbohydr. Res.* **2014**, 395, 15–18.
- (147) Zhang, Q.; Slavin, S.; Jones, M. W.; Haddleton, A. J.; Haddleton, D. M. Terminal Functional Glycopolymers via a Combination of Catalytic Chain Transfer Polymerisation (CCTP) Followed by Three Consecutive Click Reactions. *Polym. Chem.* **2012**, 3 (4), 1016–1023.
- (148) Zi, C.-T.; Xu, F.-Q.; Li, G.-T.; Li, Y.; Ding, Z.-T.; Zhou, J.; Jiang, Z.-H.; Hu, J.-M. Synthesis and Anticancer Activity of Glucosylated Podophyllotoxin Derivatives Linked via 4 β -Triazole Rings. *Molecules* **2013**, 18 (11), 13992–14012.
- (149) Guiard, J.; Fiege, B.; Kitov, P. I.; Peters, T.; Bundle, D. R. “Double-Click” Protocol for Synthesis of Heterobifunctional Multivalent Ligands: Toward a Focused Library of Specific Norovirus Inhibitors. *Chem. – Eur. J.* **2011**, 17 (27), 7438–7441.
- (150) Roy, B.; Mukhopadhyay, B. Sulfuric Acid Immobilized on Silica: An Excellent Catalyst for Fischer Type Glycosylation. *Tetrahedron Lett.* **2007**, 48 (22), 3783–3787.
- (151) Meng, B.; Zhu, Z.; Baker, D. C. 1,2-Cis Alkyl Glycosides: Straightforward Glycosylation from Unprotected 1-Thioglycosyl Donors. *Org. Biomol. Chem.* **2014**,

- 12 (28), 5182–5191.
- (152) Yeoh, K. K.; Butters, T. D.; Wilkinson, B. L.; Fairbanks, A. J. Probing Replacement of Pyrophosphate via Click Chemistry; Synthesis of UDP-Sugar Analogues as Potential Glycosyl Transferase Inhibitors. *Carbohydr. Res.* **2009**, *344* (5), 586–591.
- (153) García-Martín, F.; Bayó-Puxan, N.; Cruz, L. J.; Bohling, J. C.; Albericio, F. Chlorotriyl Chloride (CTC) Resin as a Reusable Carboxyl Protecting Group. *QSAR Comb. Sci.* **2007**, *26* (10), 1027–1035.
- (154) *Peptide Synthesis and Applications*; Jensen, K. J., Tofteng Shelton, P., Pedersen, S. L., Eds.; Methods in Molecular Biology; Humana Press: Totowa, NJ, 2013; Vol. 1047.
- (155) Castro, B.; Dormoy, J. R.; Evin, G.; Selve, C. Reactifs de Couplage Peptidique I (1) - L'hexafluorophosphate de Benzotriazolyl N-Oxytrisdiméthylamino Phosphonium (B.O.P.). *Tetrahedron Lett.* **1975**, *16* (14), 1219–1222.
- (156) Coste, J.; Le-Nguyen, D.; Castro, B. PyBOP®: A New Peptide Coupling Reagent Devoid of Toxic by-Product. *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31* (2), 205–208.
- (157) Brabez, N.; Lynch, R. M.; Xu, L.; Gillies, R. J.; Chassaing, G.; Lavielle, S.; Hruby, V. J. Design, Synthesis, and Biological Studies of Efficient Multivalent Melanotropin Ligands: Tools toward Melanoma Diagnosis and Treatment. *J. Med. Chem.* **2011**, *54* (20), 7375–7384.
- (158) Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40* (11), 2004–2021.
- (159) Peer, M. Performing Hazardous Reactions with Sodium Azide. *Spec. Chem.* **1998**, *18* (6).
- (160) Yamashita, M.; Suzuki, K.; Kato, Y.; Iida, A.; Ikai, K.; Reddy, P. M.; Oshikawa, T. Novel Synthesis and Structures of Amines and Triazole-Derived Glycoside and Nucleoside Derivatives of Phosphanyl Sugar Analogs. *J. Carbohydr. Chem.* **1999**, *18* (8), 915–935.
- (161) Hlasta, D. J.; Ackerman, J. H. Steric Effects on the Regioselectivity of an Azide-Alkyne Dipolar Cycloaddition Reaction: The Synthesis of Human Leukocyte Elastase Inhibitors. *J. Org. Chem.* **1994**, *59* (21), 6184–6189.
- (162) Rudolf, W.-D.; Janietz, D. Intramolekulare 1,3-Dipolare Cycloadditionen von Arylaziden Mit Alkynylsubstituenten. *J. Für Prakt. Chem.* **1987**, *329* (1), 55–61.

- (163) Huisgen, R.; Grashey, R.; Seidel, M.; Wallbillich, G.; Knupfer, H.; Schmidt, R. 1,3-Dipolare Additionen, II. Synthese von 1,2,4-Triazolen Aus Nitrilimininen Und Nitrilen. *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1962**, 653 (1), 105–113.
- (164) Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(I)-Catalyzed Regioselective “Ligation” of Azides and Terminal Alkynes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41 (14), 2596–2599.
- (165) Meldal, M.; Tornøe, C. W. Cu-Catalyzed Azide–Alkyne Cycloaddition. *Chem. Rev.* **2008**, 108 (8), 2952–3015.
- (166) Sreedhar, B.; Surendra Reddy, P. Sonochemical Synthesis of 1,4-Disubstituted 1,2,3-Triazoles in Aqueous Medium. *Synth. Commun.* **2007**, 37 (5), 805–812.
- (167) Liang, L.; Astruc, D. The copper(I)-Catalyzed Alkyne-Azide Cycloaddition (CuAAC) “click” Reaction and Its Applications. An Overview. *Coord. Chem. Rev.* **2011**, 255 (23–24), 2933–2945.
- (168) Hein, J. E.; Fokin, V. V. Copper-Catalyzed Azide–alkyne Cycloaddition (CuAAC) and beyond: New Reactivity of Copper(i) Acetylides. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, 39 (4), 1302–1315.
- (169) Golas, P. L.; Tsarevsky, N. V.; Sumerlin, B. S.; Matyjaszewski, K. Catalyst Performance in “Click” Coupling Reactions of Polymers Prepared by ATRP: Ligand and Metal Effects. *Macromolecules* **2006**, 39 (19), 6451–6457.
- (170) Rodionov, V. O.; Presolski, S. I.; Díaz Díaz, D.; Fokin, V. V.; Finn, M. G. Ligand-Accelerated Cu-Catalyzed Azide–Alkyne Cycloaddition: A Mechanistic Report. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129 (42), 12705–12712.
- (171) Movahedi, A.; Moth-Poulsen, K.; Eklöf, J.; Nydén, M.; Kann, N. One-Pot Synthesis of TBTA-Functionalized Coordinating Polymers. *React. Funct. Polym.* **2014**, 82, 1–8.
- (172) Sun, R.; Wang, H.; Hu, J.; Zhao, J.; Zhang, H. Pyridine-Phosphinimine Ligand-Accelerated Cu(I)-Catalyzed Azide–alkyne Cycloaddition for Preparation of 1-(pyridin-2-yl)-1,2,3-Triazole Derivatives. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, 12 (31), 5954–5963.
- (173) Connell, T. U.; Schieber, C.; Silvestri, I. P.; White, J. M.; Williams, S. J.; Donnelly, P. S. Copper and Silver Complexes of Tris(triazole)amine and Tris(benzimidazole)amine Ligands: Evidence That Catalysis of an Azide–Alkyne Cycloaddition (“Click”) Reaction by a Silver Tris(triazole)amine Complex Arises from Copper Impurities. *Inorg. Chem.* **2014**, 53 (13), 6503–6511.

- (174) Ryu, E.-H.; Zhao, Y. Efficient Synthesis of Water-Soluble Calixarenes Using Click Chemistry. *Org. Lett.* **2005**, 7 (6), 1035–1037.
- (175) Lécorché, P. Conception, Synthèse et évaluations de Peptides Vecteurs Glycosylés Pour Une Application En Vectorologie, Université Pierre et Marie Curie, 2010.
- (176) Eglinton, G.; Campbell, I. D. Diphenyldiacetylene. *Org. Synth.* **1965**, 45, 39.
- (177) Tornøe, C. W.; Christensen, C.; Meldal, M. Peptidotriazoles on Solid Phase: [1,2,3]-Triazoles by Regiospecific Copper(I)-Catalyzed 1,3-Dipolar Cycloadditions of Terminal Alkynes to Azides. *J. Org. Chem.* **2002**, 67 (9), 3057–3064.
- (178) Wang, Q.; Chan, T. R.; Hilgraf, R.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B.; Finn, M. G. Bioconjugation by Copper(I)-Catalyzed Azide-Alkyne [3 + 2] Cycloaddition. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125 (11), 3192–3193.
- (179) Gopi, H. N.; Tirupula, K. C.; Baxter, S.; Ajith, S.; Chaiken, I. M. Click Chemistry on Azidoproline: High-Affinity Dual Antagonist for HIV-1 Envelope Glycoprotein gp120. *ChemMedChem* **2006**, 1 (1), 54–57.
- (180) Holub, J. M.; Jang, H.; Kirshenbaum, K. Clickity-Click: Highly Functionalized Peptoid Oligomers Generated by Sequential Conjugation Reactions on Solid-Phase Support. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, 4 (8), 1497–1502.
- (181) Zhang, Z.; Fan, E. Solid Phase Synthesis of Peptidotriazoles with Multiple Cycles of Triazole Formation. *Tetrahedron Lett.* **2006**, 47 (5), 665–669.
- (182) Cornier, P. G.; Boggián, D. B.; Mata, E. G.; Delpiccolo, C. M. L. Solid-Phase Based Synthesis of Biologically Promising Triazolyl Aminoacyl (peptidyl) Penicillins. *Tetrahedron Lett.* **2012**, 53 (6), 632–636.
- (183) Franke, R.; Doll, C.; Eichler, J. Peptide Ligation through Click Chemistry for the Generation of Assembled and Scaffolded Peptides. *Tetrahedron Lett.* **2005**, 46 (26), 4479–4482.
- (184) Hüttel, C.; Hettrich, C.; Riedel, M.; Henklein, P.; Rawel, H.; Bier, F. F. Development of Peptidyl Lysine Dendrons: 1,3-Dipolar Cycloaddition for Peptide Coupling and Antibody Recognition. *Chem. Biol. Drug Des.* **2015**, 85 (5), 565–573.
- (185) Jøllck, R. I.; Berg, R. H.; Andresen, T. L. Solid-Phase Synthesis of PEGylated Lipopeptides Using Click Chemistry. *Bioconjug. Chem.* **2010**, 21 (5), 807–810.
- (186) Wang, D.; Li, N.; Zhao, M.; Shi, W.; Ma, C.; Chen, B. Solvent-Free Synthesis of 1,4-Disubstituted 1,2,3-Triazoles Using a Low Amount of Cu(PPh₃)₂NO₃ Complex. *Green Chem.* **2010**, 12 (12), 2120–2123.

- (187) Rijkers, D. T. S.; Esse, G. W. van; Merkx, R.; Brouwer, A. J.; Jacobs, H. J. F.; Pieters, R. J.; Liskamp, R. M. J. Efficient Microwave-Assisted Synthesis of Multivalent Dendrimeric Peptides Using Cycloaddition Reaction (click) Chemistry. *Chem. Commun.* **2005**, No. 36, 4581–4583.
- (188) Schneggenburger, P. E.; Worbs, B.; Diederichsen, U. Azide Reduction during Peptide Cleavage from Solid Support-the Choice of Thioscavenger? *J. Pept. Sci. Off. Publ. Eur. Pept. Soc.* **2010**, 16 (1), 10–14.
- (189) Bollhagen, R.; Schmiedberger, M.; Barlos, K.; Grell, E. A New Reagent for the Cleavage of Fully Protected Peptides Synthesised on 2-Chlorotrityl Chloride Resin. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1994**, No. 22, 2559–2560.
- (190) Bosman, A. W.; Janssen, H. M.; Meijer, E. W. About Dendrimers: Structure, Physical Properties, and Applications. *Chem. Rev.* **1999**, 99 (7), 1665–1688.
- (191) Vögtle, F.; Richardt, G.; Werner, N. *Dendrimer Chemistry*; John Wiley & Sons, 2009.
- (192) Fernandez-Megia, E.; Correa, J.; Rodríguez-Meizoso, I.; Riguera, R. A Click Approach to Unprotected Glycodendrimers. *Macromolecules* **2006**, 39 (6), 2113–2120.
- (193) Pesak, D. J.; Moore, J. S.; Wheat, T. E. Synthesis and Characterization of Water-Soluble Dendritic Macromolecules with a Stiff, Hydrocarbon Interior. *Macromolecules* **1997**, 30 (21), 6467–6482.
- (194) Fritz, D.; Bräse, S. Solid-Phase Synthesis of (ω -Aminoalkyl)peptoids Using Azide Chemistry. *Synlett* **2010**, 2010 (10), 1544–1548.
- (195) Bayley, H.; Standring, D. N.; Knowles, J. R. Propane-1,3-Dithiol: A Selective Reagent for the Efficient Reduction of Alkyl and Aryl Azides to Amines. *Tetrahedron Lett.* **1978**, 19 (39), 3633–3634.
- (196) Drouillat, B.; Kellam, B.; Dekany, G.; Starr, M. S.; Toth, I. Solid Phase Synthesis of C-Terminal Carbohydrate Modified Enkephalins. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, 7 (17), 2247–2250.
- (197) Bartra, M.; Romea, P.; Urpí, F.; Vilarrasa, J. A Fast Procedure for the Reduction of Azides and Nitro Compounds Based on the Reducing Ability of Sn(SR)₃-Species. *Tetrahedron* **1990**, 46 (2), 587–594.
- (198) Sun, S.; Wu, P. Mechanistic Insights into Cu(I)-Catalyzed Azide–Alkyne “Click” Cycloaddition Monitored by Real Time Infrared Spectroscopy. *J. Phys. Chem. A* **2010**, 114 (32), 8331–8336.

- (199) Coats, S. J.; Link, J. S.; Gauthier, D.; Hlasta, D. J. Trimethylsilyl-Directed 1,3-Dipolar Cycloaddition Reactions in the Solid-Phase Synthesis of 1,2,3-Triazoles. *Org. Lett.* **2005**, 7 (8), 1469–1472.
- (200) Chan-Seng, D.; Lutz, J.-F. Primary Structure Control of Oligomers Based on Natural and Synthetic Building Blocks. *ACS Macro Lett.* **2014**, 3 (3), 291–294.
- (201) Thomas, B.; Fiore, M.; Daskhan, G. C.; Spinelli, N.; Renaudet, O. A Multi-Ligation Strategy for the Synthesis of Heterofunctionalized Glycosylated Scaffolds. *Chem. Commun.* **2015**, 51 (25), 5436–5439.
- (202) Cudic, M.; Marí, F.; Fields, G. B. Synthesis and Solid-Phase Application of Suitably Protected γ -Hydroxyvaline Building Blocks. *J. Org. Chem.* **2007**, 72 (15), 5581–5586.
- (203) Domingue, P. A. G.; Mottle, B.; Morck, D. W.; Borwn, M. R. W.; Costerton, J. W. A Simplified Rapid Method for the Removal of Iron and Other Cations from Complex Media. *J. Microbiol. Methods* **1990**, 12 (1), 13–22.
- (204) Auberger, N.; Pisa, M. D.; Larregola, M.; Chassaing, G.; Peroni, E.; Lavielle, S.; Papini, A.-M.; Lequin, O.; Mallet, J.-M. Glaser Oxidative Coupling on Peptides: Stabilization of β -Turn Structure via a 1,3-Butadiyne Constraint. *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, 22 (24), 6924–6932.
- (205) Kabiri, R.; Namazi, H. Surface Grafting of Reduced Graphene Oxide Using Nanocrystalline Cellulose via Click Reaction. *J. Nanoparticle Res.* **2014**, 16 (7), 1–13.
- (206) Handbook Biacore.
- (207) Surface Plasmon Resonance Applications
http://www.alvtechnologies.com.ph/index.php?option=com_content&view=article&id=298:spr-applications&catid=11:news&Itemid=6 (accessed Nov 30, 2015).
- (208) Timpano, G.; Tabarani, G.; Anderluh, M.; Invernizzi, D.; Vasile, F.; Potenza, D.; Nieto, P. M.; Rojo, J.; Fieschi, F.; Bernardi, A. Synthesis of Novel DC-SIGN Ligands with an α -Fucosylamide Anchor. *ChemBioChem* **2008**, 9 (12), 1921–1930.
- (209) Tabarani, G.; Reina, J. J.; Ebel, C.; Vivès, C.; Lortat-Jacob, H.; Rojo, J.; Fieschi, F. Mannose Hyperbranched Dendritic Polymers Interact with Clustered Organization of DC-SIGN and Inhibit gp120 Binding. *FEBS Lett.* **2006**, 580 (10), 2402–2408.
- (210) Varga, N.; Sutkeviciute, I.; Ribeiro-Viana, R.; Berzi, A.; Ramdasi, R.; Daggetti, A.;

- Vettoretti, G.; Amara, A.; Clerici, M.; Rojo, J.; et al. A Multivalent Inhibitor of the DC-SIGN Dependent Uptake of HIV-1 and Dengue Virus. *Biomaterials* **2014**, *35* (13), 4175–4184.
- (211) Luczkowiak, J.; Sattin, S.; Sutkevičiūtė, I.; Reina, J. J.; Sánchez-Navarro, M.; Thépaut, M.; Martínez-Prats, L.; Daggetti, A.; Fieschi, F.; Delgado, R.; et al. Pseudosaccharide Functionalized Dendrimers as Potent Inhibitors of DC-SIGN Dependent Ebola Pseudotyped Viral Infection. *Bioconjug. Chem.* **2011**, *22* (7), 1354–1365.
- (212) Doknic, D.; Abramo, M.; Sutkeviciute, I.; Reinhardt, A.; Guzzi, C.; Schlegel, M. K.; Potenza, D.; Nieto, P. M.; Fieschi, F.; Seeberger, P. H.; et al. Synthesis and Characterization of Linker-Armed Fucose-Based Glycomimetics. *Eur. J. Org. Chem.* **2013**, *2013* (24), 5303–5314.
- (213) Ordanini, S.; Varga, N.; Porkolab, V.; Thépaut, M.; Belvisi, L.; Bertaglia, A.; Palmioli, A.; Berzi, A.; Trabattoni, D.; Clerici, M.; et al. Designing Nanomolar Antagonists of DC-SIGN-Mediated HIV Infection: Ligand Presentation Using Molecular Rods. *Chem. Commun.* **2015**, *51* (18), 3816–3819.
- (214) Sattin, S.; Daggetti, A.; Thépaut, M.; Berzi, A.; Sánchez-Navarro, M.; Tabarani, G.; Rojo, J.; Fieschi, F.; Clerici, M.; Bernardi, A. Inhibition of DC-SIGN-Mediated HIV Infection by a Linear Trimannoside Mimic in a Tetravalent Presentation. *ACS Chem. Biol.* **2010**, *5* (3), 301–312.

Résumé

Mots clefs : Glycodendrimères, CuAAC, fucoses, SPPS, cellules dendritiques, DC-SIGN, interactions biologiques, Biacore®

DC-SIGN est une lectine tétramérique impliquée dans la réponse immunitaire adaptative; Elle reconnaît à la fois les ligands mannosylés et fucosylés. Bien que les interactions protéine-saccharide soient essentielles à de multiples processus biologiques, les interactions individuelles sont faibles (de l'ordre du mM), ainsi, la multivalence du ligand est nécessaire.

La première partie de ce projet est la construction d'un ligand polyfucosylé de DC-SIGN. Une structure multivalente dendrimérique est choisie pour son bon contrôle de la géométrie et de l'homogénéité (macroscopique et microscopique).

Dans une seconde partie, la stratégie de synthèse a été adaptée à différents monomères pour produire de multiples glycodendrimères. Ceux-ci pourront donner des renseignements sur la structure la plus adaptée aux interactions avec DC-SIGN.

Abstract

Key words : Glycodendrimers, CuAAC, fucosis, SPPS, dendritic cells, DC-SIGN, biological interaction, Biacore®

DC-Sign is a tetrameric lectin presents on dendritic cells involved in the adaptive immune response; It recognizes both mannosylated and fucosylated ligands. Although protein-carbohydrate interactions are essential to many biological processes, individual interactions usually exhibit weak binding affinities (mM range), thus multivalency of the ligand is required.

The first part of our project is the construction of a very active yet simple fucosylated synthetic ligands for DC-SIGN. As multivalent structure, dendrimers are chosen for their good control both in geometry and in homogeneity (macroscopic and microscopic).

In a second part, the synthesis strategy was adapted to different monomers to produce various glycodendrimers. They could give us information on the more adapted structure for DC-SIGN interaction.